

Die Rolle von Tetrapyrrolen der Chlorophyllbiosynthese bei der retrograden Signalgebung in *Arabidopsis thaliana*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Hagen Schlicke

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Bernhard Grimm
2. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
3. Prof. Dr. Iris Finkemeier

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Zusammenfassung | VII |
| Abstract..... | IX |
| Abkürzungsverzeichnis | XI |
| Abbildungsverzeichnis | XIV |
| Tabellenverzeichnis | XVII |
| Publikationsliste | XVIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Die Stoffklasse der Tetrapyrrole | 1 |
| 1.1.1 Bedeutung von Tetrapyrrolen | 1 |
| 1.1.2 Struktur von Tetrapyrrolen | 2 |
| 1.2 Die Tetrapyrrolbiosynthese | 3 |
| 1.2.1 Die Synthese der 5-Aminolävulinsäure | 6 |
| 1.2.2 Die Synthese von Protoporphyrin IX..... | 6 |
| 1.2.3 Der Fe-Zweig..... | 7 |
| 1.2.4 Der Mg-Zweig | 8 |
| 1.2.4.1 Die Magnesium-Chelatase | 9 |
| 1.2.4.2 Die Magnesium-Protoporphyrin-IX-Methyltransferase..... | 9 |
| 1.2.4.3 Die oxidative Magnesium-Protoporphyrin-IX-Monomethylester-Zyklase | 10 |
| 1.2.5 Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese..... | 10 |
| 1.2.5.1 Transkriptionelle Kontrolle von Genen der TPBS | 11 |
| 1.2.5.2 Redoxregulation von Enzymen der TPBS | 12 |
| 1.2.5.3 Phosphorylierung von Enzymen der TPBS..... | 13 |
| 1.3 Retrograde Signalgebung zwischen Plastiden und Zellkern | 13 |
| 1.3.1 Signale aus der TPBS | 15 |
| 1.3.2 Porphyrine als retrograde Signale..... | 16 |

| | |
|--|----|
| 1.4 Zielstellung | 18 |
| 2 Material und Methoden | 20 |
| 2.1 Chemikalien | 20 |
| 2.2 Geräte | 20 |
| 2.3 Biologisches Material..... | 22 |
| 2.3.1 Pflanzen - Anzuchtbedingungen, Behandlung und Probenvorbereitung..... | 22 |
| 2.3.2 Bakterien und deren Kultivierung..... | 23 |
| 2.3.3 Erzeugung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen mit induzierbarer Reprimierung der Expression von Genen der Tetrapyrrolbiosynthese..... | 23 |
| 2.4 Transformationstechniken..... | 25 |
| 2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 25 |
| 2.4.2 Transformation von <i>E. coli</i> | 25 |
| 2.4.3 Herstellung elektrisch kompetenter Agrobakterien | 25 |
| 2.4.4 Transformation von Agrobakterien | 26 |
| 2.4.5 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 26 |
| 2.5 Molekularbiologische Arbeitstechniken | 27 |
| 2.5.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | 27 |
| 2.5.2 Isolation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 27 |
| 2.5.3 DNA-Gelelektrophorese | 27 |
| 2.5.4 DNA-Sequenzierung..... | 28 |
| 2.5.5 PCR und Kolonie-PCR..... | 28 |
| 2.6 RNA-Techniken | 28 |
| 2.6.1 Isolation von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 28 |
| 2.6.2 RNA-Gelelektrophorese | 29 |
| 2.6.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription | 29 |
| 2.6.4 qRT-PCR-Analysen..... | 29 |
| 2.6.5 Transkriptom-Analysen | 30 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.7 | Proteintechniken..... | 30 |
| 2.7.1 | Proteinisolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 30 |
| 2.7.2 | Proteinbestimmung mit Bradford oder BCA..... | 31 |
| 2.7.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 31 |
| 2.7.4 | Western Blot-Analysen..... | 32 |
| 2.8 | Bestimmung von Enzymaktivitäten..... | 33 |
| 2.8.1 | Herstellung von Chloroplastensuspensionen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 33 |
| 2.8.2 | Assay zur Bestimmung von Enzymaktivitäten..... | 33 |
| 2.8.2.1 | Bestimmung der Aktivität der Mg-Chelatase..... | 34 |
| 2.8.2.2 | Bestimmung der Aktivität der Methyltransferase..... | 34 |
| 2.8.2.3 | Bestimmung der Aktivität der MgPME-Zyklase..... | 34 |
| 2.8.3 | Bestimmung der ALA-Synthesekapazität..... | 34 |
| 2.9 | HPLC-Analysen von Metaboliten der Chlorophyllbiosynthese..... | 35 |
| 2.9.1 | Herstellung von Pflanzenextrakten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 35 |
| 2.9.2 | Bestimmung der Chlorophyllgehalte..... | 36 |
| 2.9.3 | Bestimmung der Porphyringehalte..... | 37 |
| 2.9.4 | Bestimmung der Gehalte an Protochlorophyllid und Chlorophyllid..... | 37 |
| 2.9.5 | Bestimmung des Häm-Gehaltes..... | 37 |
| 3 | Ergebnisse..... | 39 |
| 3.1 | Erzeugung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten mit induzierbarer Reprimierung der Expression von Genen der Tetrapyrrolbiosynthese..... | 39 |
| 3.1.1 | Zeitlich aufgelöste Untersuchungen der mRNA-Gehalte von AtCHLD in der CHLD-RNAi-Linie #10h nach Induktion des RNAi-Mechanismus durch Dexamethason..... | 41 |
| 3.2 | Untersuchung der Folgen einer Kurzzeitinduktion..... | 43 |
| 3.2.1 | Der Einfluss der reprimierten Genexpression von AtCHLH, AtCHLD, AtCHLM oder AtCHL27 auf Transkriptmengen anderer Gene des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese nach Kurzzeitinduktion..... | 43 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.2 | Reduzierte Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der MgPME-Zyklase nach Kurzzeitinduktion | 45 |
| 3.2.3 | Veränderte Gehalte von Metaboliten des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese in den RNAi-Linien nach Kurzzeitinduktion | 46 |
| 3.2.4 | Unveränderte Chlorophyllgehalte 24 h nach Reprimierung der <i>AtCHLH</i> -, <i>AtCHLD</i> -, <i>AtCHLM</i> - und <i>AtCHL27</i> -Expression | 48 |
| 3.2.5 | Reduzierte ALA-Syntheseraten 24 h nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> -, <i>AtCHLD</i> -, <i>AtCHLM</i> - und <i>AtCHL27</i> | 50 |
| 3.2.6 | Unveränderte Gehalte der Enzyme der TPBS und Proteinen der Lichtsammelkomplexe nach Kurzzeitinduktion | 51 |
| 3.3 | Transkriptom-Analysen nach Kurzzeitinduktion | 53 |
| 3.3.1 | Transkriptom-Analysen der RNAi-Linien 24 Stunden nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 53 |
| 3.3.2 | Veränderungen der Expression kerncodierter Gene 24 Stunden nach Induktion des RNAi-Mechanismus in der <i>CHLH</i> -, <i>CHLM</i> - und <i>CHL27</i> -RNAi-Linie | 54 |
| 3.3.3 | Deregulation von Genen in den <i>CHLH</i> -, <i>CHLM</i> -, <i>CHL27</i> - und der Kontroll-RNAi-Linie nach Kurzzeitinduktion | 55 |
| 3.3.4 | Validierung der <i>microarray</i> -Daten der veränderten Genexpressionen in den RNAi-Linien mittels qRT-PCR Analysen nach Kurzzeitinduktion | 57 |
| 3.3.5 | Einheitliche Deregulation von Genen in den vier RNAi-Linien | 59 |
| 3.3.6 | Analyse der Transkriptgehalte von PhANGs, TPBS-Genen und ROS-Marker-Genen 24 h nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 61 |
| 3.3.7 | Gene von Stress- und Abwehrantworten sind überrepräsentiert in der Gruppe der 99 einheitlich deregulierten Gene in der <i>CHLH</i> -, <i>CHLM</i> -, <i>CHL27</i> - und <i>LUC</i> -RNAi-Linie..... | 62 |
| 3.3.8 | Expressionsanalyse der 34 gemeinsam deregulierter Gene in der <i>CHLH</i> -, <i>CHLM</i> - und <i>CHL27</i> -RNAi-Linie | 63 |
| 3.4 | Untersuchung der Folgen einer Langzeitinduktion | 67 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.4.1 | Phänotypen der RNAi-Pflanzen nach Langzeitinduktion..... | 67 |
| 3.4.2 | Kinetik der Metabolitgehalte des Mg-Zweigs der TPBS während der Langzeitinduktion | 69 |
| 3.4.3 | Chlorophyllgehalte nach viertägiger Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 71 |
| 3.4.4 | Auswirkungen der Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> auf andere Bereiche der Chlorophyllbiosynthese | 73 |
| 3.4.5 | Transkriptanalysen repräsentativer PhANGs, Markergene für ROS und regulatorisch relevanter Gene der Tetrapyrrolbiosynthese während der Langzeitinduktion | 75 |
| 3.4.5.1 | Transkriptanalysen von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion | 75 |
| 3.4.5.2 | Reduktion der Genexpression von PhANGs in der <i>CHL27</i> -RNAi-Linie nach Langzeitinduktion | 77 |
| 3.4.5.3 | Erhöhung der Expression von Markergenen für reaktive Sauerstoffspezies in der <i>CHL27</i> -RNAi-Linie nach Langzeitinduktion | 78 |
| 3.4.5.4 | Starke Erhöhung der Expression der Ferrochelatase 1 in der <i>CHL27</i> - RNAi-Linie nach Langzeitinduktion..... | 80 |
| 4 | Diskussion | 83 |
| 4.1 | Induzierbare RNAi-Linien als Voraussetzungen zur Untersuchung von primären Signalen aus der TPBS | 84 |
| 4.2 | Änderung der Expression von Kerngenen nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 86 |
| 4.3 | Mögliche Ursachen für die unspezifische Deregulation der Expression von Genen in den induzierten RNAi-Linien..... | 88 |
| 4.4 | Die Rolle von TPBS-vermittelten Signalen zur Regulation der Expression von Kerngenen | 89 |
| 4.5 | Die Rolle von Proto IX und ALA als Signalmoleküle..... | 94 |
| 4.6 | Die Folgen der Langzeit-Geninaktivierung..... | 96 |
| 4.7 | Die Rolle von Häm nach Langzeitinduktion..... | 99 |
| 4.8 | Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen..... | 100 |

| | |
|---------------------------------|---------|
| Literaturverzeichnis | XX |
| Anhang | XXXVIII |
| Eidesstattliche Erklärung | LIV |

Zusammenfassung

In photosynthetischen Organismen vermitteln Tetrapyrrole während der Chloroplastenbiogenese und als Antwort auf Veränderungen des Entwicklungszustandes sowie wechselnder Umweltbedingungen retrograde Signale zur Kontrolle der Expression von Kerngenen (NGE). In der vorliegenden Arbeit wurde ein induzierbares RNAi-System in *Arabidopsis* eingesetzt, um enzymatische Schritte des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese (TPBS) zu inaktivieren. Es sollte gezeigt werden, inwiefern Tetrapyrrole zu einer kontinuierlichen Regulation der NGE beitragen, um abhängig von durch wechselnde Umweltbedingungen bedingte Veränderungen der TPBS, die Homöostase der Chloroplasten zu justieren. Die induzierte Inaktivierung von Enzymen der TPBS in zwei Wochen alten *Arabidopsis*-Keimlingen mit photosynthetisch aktiven Chloroplasten sollte zur Untersuchung von Tetrapyrrol-vermittelten retrograden Signalwegen beitragen. Die spezifische, induzierte Geninaktivierung der Gene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* welche für die Untereinheiten CHLH und CHLD der Mg-Chelatase, für die Mg-Protoporphyrin-IX-Methyltransferase (Methyltransferase) und die Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester-Zyklase (Zyklase) kodieren, führte innerhalb von 24 h zu einer Reduktion der Transkripte der Zielgene, zu verminderten Aktivitäten der jeweiligen Enzyme und Änderungen der *steady state*-Gehalte von Intermediaten der TPBS. Als Folge der veränderten Enzymaktivitäten im Mg-Zweig der TPBS war außerdem eine Reduktion der ALA-Syntheserate zu beobachten. Weiterhin zeigten Untersuchungen zur Kurzzeitinduktion, dass veränderte Gehalte an Mg-Protoporphyrin IX (MgP), Mg-Protoporphyrin IX-monomethylester (MgPME) und Protochlorophyllid (Pchlid) als Folge verminderter Enzymaktivitäten nicht primär zu einer Anpassung der NGE innerhalb der ersten 24 h führen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden nach Langzeitinduktion der Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLD* und *AtCHLM* leichte Veränderungen der Transkriptgehalte von *photosynthesis-associated nuclear genes* (PhANGs) und TPBS-assoziierten Genen nach 4 Tagen beobachtet. Außerdem entwickelten diese Keimlinge als Folge reduzierter Chlorophyllgehalte einen hellgrünen Phänotyp. Die Keimlinge der CHL27-RNAi-Linie akkumulieren große Mengen des photoaktiven MgPMEs, das Substrat der Zyklase, was während der Belichtung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zu nekrotischen Pflanzengewebe führte. Die ROS-vermittelten Signale führten zu einer Induktion der Expression von ROS-Markergenen und einer Reduktion der

Transkriptgehalte von PhANGs. Diese Untersuchungen weisen auf ein komplexes, vielschichtiges Signalnetzwerk aus retrograden und anterograden Signalwegen unter der Mitwirkung transkriptionellen und posttranslationalen Regulationsmechanismen hin. Es wird angenommen, dass Veränderungen der TPBS über ROS-Signalwege oder Redox-vermittelte Signale zur Regulation der NGE beitragen. Diese Signale könnten aus beeinträchtigten Photosystemen stammen, welche eine Folge der Akkumulation von photoreaktiven Intermediaten und unzureichenden Mengen an Chlorophyll sein können.

Abstract

In photosynthetic organisms, tetrapyrroles are known to mediate retrograde control of nuclear gene expression (NGE) during chloroplast biogenesis in response to developmental and environmental changes. In these studies, an inducible RNAi system was used in *Arabidopsis* plants to inactivate enzymatic steps in the Mg-branch of tetrapyrrole biosynthesis (TPBS). It was intended to proof whether tetrapyrroles contribute to a permanent regulation of NGE due to changes in the TPBS and in response to environmental changes to achieve an adjustment of chloroplast homeostasis. The induced inactivation of TPBS enzymes in two weeks old *Arabidopsis* seedlings with functional photosynthetically active chloroplasts were used to examine tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. The specifically induced gene silencing of *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* and *AtCHL27* encoding the CHLH and CHLD subunit of Mg chelatase, the Mg protoporphyrin methyltransferase (methyltransferase) and Mg protoporphyrin monomethylester cyclase (cyclase), respectively, lead within a 24 h period to a reduced level of corresponding transcripts, followed by a loss of enzyme activity as well as changes in steady state levels of tetrapyrrole intermediates. Regulation mechanisms due to changes in enzyme activity in the Mg branch of TPBS lead to reduced ALA synthesis rate. Additionally, the investigations of short-term responses due to altered levels of Mg protoporphyrin (MgP), Mg protoporphyrin monomethylester (MgPME) and protochlorophyllide (Pchlid) caused by a robust down-regulation of enzyme activity within the first 24 h reveal that these Mg porphyrins do not primarily contribute to the modulation of NGE. In a second approach, long-term studies show slightly altered transcript levels of photosynthesis-associated nuclear genes (PhANGs) and tetrapyrrole-associated genes after four days of gene silencing of *AtCHLH*, *AtCHLD* and *AtCHLM*. Moreover, these seedlings developed a pale green phenotype due to reduced metabolic flow and reduced chlorophyll levels. The seedlings of the *CHL27*-RNAi line accumulated high amounts of the photoactive MgPME, the substrate of the cyclase, which lead to the production of reactive oxygen species (ROS) during illumination and a necrotic phenotype. The ROS-triggered retrograde signaling prompted the expression of ROS-induced reference genes and resulted in reduced PhANG transcript levels. These investigations indicate a complex multi-layered signaling network of anterograde and retrograde control and contributions of transcriptional as well as posttranslational regulation mechanisms. It is proposed that changes in the TPBS mediate the regulation of NGE via

ROS-signaling pathways or redox signals deriving from disturbed photosystems due to accumulation of photoreactive intermediates and the lack of chlorophyll.

.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| ALA | 5-Aminolävulinsäure |
| <i>Arabidopsis</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| AS | antisense |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | base pairs (Basenpaare) |
| Ca. | <i>CIRCA</i> |
| CaMV | <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CDS | <i>coding DNA sequence</i> |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | doppelt-destilliertes Wasser |
| DM | Dexamethason |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | desoxyribonucleoside triphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> |
| et al. | <i>ET ALTERA</i> |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| etc. | <i>ET CETERA</i> |
| Fe-Zweig | Eisen-Zweig |
| FM | Feuchtmasse |
| fwd | <i>forward</i> |
| gDNA | genomic DNA |
| M | Molar |
| Mg-Zweig | Magnesium-Zweig |
| Min | Minuten |

| | |
|---------|---|
| μE | microeinstein |
| MQ | Milli-Q® Water (ultrapure water) |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| n | Anzahl biologischer Replikate |
| NGE | <i>nuclear gene expression</i> (Expression von Kerngenen) |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| qRT-PCR | <i>quantitative Real Time PCR</i> |
| rev | <i>reverse</i> |
| RNA | <i>ribonucleid acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies) |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| SAM | S-Adenosyl-L-Methionin |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| Sec | Sekunde |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TBS-T | Tris-buffered saline inkl. Triton |
| T-DNA | <i>Transferred DNA of the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciensis</i> |
| TM | Trockenmasse |
| Ti | <i>Tumor-inducing</i> |
| TP | Tetrapyrrol |
| TPBS | Tetrapyrrolbiosynthese |
| UE | Untereinheit |
| UTR | <i>untranslated region</i> |
| UV | <i>ultra violet</i> |
| ÜN | über Nacht |

| | |
|---------|--|
| Vol | Volumen |
| v/v | volume per volume |
| w/v | weight per volume |
| Wildtyp | <i>A. thaliana</i> L. HEYNH., Ökotyp Columbia (Col-0) |
| x g | <i>times gravitational acceleration</i> |
| °C | Grad Celsius |
| 35S | konstitutiver Promotor des <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Darstellung des zyklischen Tetrapyrrolgrundgerüsts am Beispiel von Protoporphyrin IX. | 3 |
| Abbildung 2: Überblick über die Enzyme (links) und Metabolite (rechts) der Chlorophyllbiosynthese. GUN4 ist ein positiver Regulator der Mg-Chelatase. SAM: S-Adenosyl-L-methionin. NADPH: Nicotinamidadenindinucleotidphosphat | 5 |
| Abbildung 3 Überblick über die Enzyme (links) und Metabolite (rechts) der Häm- und Bilin-Biosynthese..... | 8 |
| Abbildung 4: Quantitative RT-PCR Analysen zeigten eine schnelle Reduktion der <i>AtCHLD</i> Transkripte in der CHLD-RNAi-Linie #10h nach Dexamethasonbehandlung. | 41 |
| Abbildung 5: Quantitative RT-PCR Analysen zeigten eine stabile Reprimierung der mRNA-Gehalte von <i>AtCHLD</i> nach Behandlung der CHLD-RNAi-Linie #10h mit Dexamethason. | 42 |
| Abbildung 6: Chlorotischer Phänotyp bei einer repräsentativen <i>Arabidopsis</i> -Pflanze der CHLD-RNAi-Linie..... | 43 |
| Abbildung 7: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte der <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> in den RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit Dexamethason. | 44 |
| Abbildung 8: Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der MgPME-Zyklase der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason. | 45 |
| Abbildung 9: Gehalte von Intermediaten des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason. | 47 |
| Abbildung 10: Chlorophyllgehalte der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason. | 49 |
| Abbildung 11: Repräsentative Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie vor und 24 h nach der Behandlung mit Dexamethason. | 49 |
| Abbildung 12: Relative ALA-Syntheserate der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason..... | 50 |
| Abbildung 13: Proteingehalte von Enzymen der ALA-Synthese, des Mg-Zweigs der TPBS und Proteinen der Lichtsammelkomplexe der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie nach Kurzzeitinduktion. | 52 |

| | |
|--|---------|
| Abbildung 14: <i>heatmap</i> Darstellung der <i>microarray</i> -Daten von allen deregulierten Genen der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason. | 54 |
| Abbildung 15: Venndiagramm zum Vergleich der deregulierten Gene der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit Dexamethason. | 56 |
| Abbildung 16: Expressionsmuster der einheitlich deregulierten Gene der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC RNAi-Linie in einem vergleichbaren Experiment. | 60 |
| Abbildung 17: Expressionsmuster der 34 einheitlich deregulierten in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie in <i>gun</i> -Mutanten mit und ohne Behandlung von Norflurazon.... | 66 |
| Abbildung 18: Repräsentative RNAi-Pflanzen nach Langzeitinduktion auf MS-Nährmedium mit Dexamethason. | 68 |
| Abbildung 19: Kinetik der Metabolitgehalte von Intermediaten des Mg-Zweigs der TPBS nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 70 |
| Abbildung 20: Kinetik der Gehalte von Chlorophyll <i>a/b</i> nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 72 |
| Abbildung 21: Kinetik der Hämgehalte nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 73 |
| Abbildung 22: Kinetik der ALA-Syntheserate nach Reprimierung der Expression von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> | 74 |
| Abbildung 23: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von <i>AtCHLH</i> , <i>AtCHLD</i> , <i>AtCHLM</i> und <i>AtCHL27</i> in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason. | 76 |
| Abbildung 24: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von PhANGs in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason. | 78 |
| Abbildung 25: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von ROS-Markergenen in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason. | 79 |
| Abbildung 26: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von TPBS-Genen in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason. | 81 |
| Abbildung 27: Repräsentative Keimlinge des Wildtyp und der RNAi-Linien nach kontinuierlicher Applikation von DM. | XXXVIII |
| Abbildung 28: Gegenüberstellung der <i>microarray</i> -Daten in einer <i>heatmap</i> von 99 einheitlich deregulierten Genen der RNAi-Linien. | XXXIX |

Abbildung 29: Gegenüberstellung der microarray-Daten von deregulierten Genen der
CHLH- CHLM- und CHL27-RNAi-Linie und der LUC-RNAi-LinieXL

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|------|
| Tabelle 1: Übersicht von Herstellern der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien..... | 20 |
| Tabelle 2: Zusammenstellung von Geräten, die bei dieser Arbeit zum Einsatz kamen. | 21 |
| Tabelle 3: Übersicht über Antikörper, die für die Hybridisierung von Western Blot Membranen verwendet wurden. | 32 |
| Tabelle 4: Übersicht über die pOpOff2-Konstrukte und die verwendeten induzierbaren <i>Arabidopsis</i> RNAi-Linien. | 40 |
| Tabelle 5: Validierung der <i>microarray</i> -Daten mittels quantitativer RT-PCR..... | 58 |
| Tabelle 6: GO-Analyse von Genen mit deregulierter Expression in mindestens einer der untersuchten RNAi-Linien. | 63 |
| Tabelle 7: Die <i>fold change</i> -Werte der 34 gemeinsam deregulierten Gene in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie..... | 65 |
| Tabelle 8: Liste der deregulierten Gene nach 24 h Reprimierung derExpression von <i>AtCHLH</i> | XL |
| Tabelle 9: Liste der deregulierten Gene nach 24 h Reprimierung derExpression von <i>AtCHLM</i> | XLIV |
| Tabelle 10: Liste der deregulierten Gene nach 24 h Reprimierung derExpression von <i>AtCHL27</i> | XLVI |
| Tabelle 11: Sequenzen der klonierten RNAi-Fragmente | XLIX |
| Tabelle 12: Primertabelle..... | XLIX |
| Tabelle 13: Ausschließlich deregulierte Gene in den RNAi-Linien..... | LII |
| Tabelle 14: Zugehörigkeit der deregulierten Gene zu den verschiedenen Schnittmengen zwischen den RNAi-Linien | LII |

PublikationslisteZeitschriftenbeiträge:

Kim S, **Schlicke H**, Van Ree K, Karvonen K, Subramaniam A, Richter A, Grimm B, Braam J. 2013. Arabidopsis Chlorophyll Biosynthesis: An Essential Balance between the Methylerythritol Phosphate and Tetrapyrrole Pathways. *Plant Cell* 25: 4984-4993.

Luo T, Luo S, Araujo WL, **Schlicke H**, Rothbart M, Yu J, Fan T, Fernie AR, Grimm B, Luo M. 2013. Virus-induced gene silencing of pea CHLI and CHLD affects tetrapyrrole biosynthesis, chloroplast development and the primary metabolic network. *Plant Physiol Biochem* 65: 17-26.

Richter AS, Peter E, Rothbart M, **Schlicke H**, Toivola J, Rintamaki E, Grimm B. 2013. Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* 162: 63-73.

Scharfenberg M, Mittermayr L, von Roepenack-Lahaye E, **Schlicke H**, Grimm B, Leister D, Kleine T. 2015. Functional characterization of the two ferrochelatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 38: 280-298.

Brzezowski P, **Schlicke H**, Richter A, Dent RM, Niyogi KK, Grimm B. 2014. The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 79: 285-298.

Kleckner M, Gasch P, Peisker H, Dormann P, **Schlicke H**, Grimm B, Mustroph A. 2014. A Shoot-Specific Hypoxic Response of *Arabidopsis* Sheds Light on the Role of the Phosphate-Responsive Transcription Factor PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1. *Plant Physiol* 165: 774-790.

Schlicke H, Hartwig AS, Firtzlaff V, Richter AS, Gläßer C, Maier K, Finkemeier I, Grimm B. 2014. Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. *Mol Plant* 7: 1211-1227.

Dietzel L, Gläßer C, Liebers M, Hiekel S, Courtois F, Czarnecki O, **Schlicke H**, Zubo Y, Börner T, Mayer K, Grimm B, Pfannschmidt T. 2015. Identification of early nuclear target genes of plastidial redox signals that trigger the long-term response of *Arabidopsis* to light quality shifts. *Mol Plant* 8: 1237-1252.

Röding A, Dietzel L, **Schlicke H**, Grimm B, Sandmann G, Buchel C. 2015. Production of ketocarotenoids in tobacco alters the photosynthetic efficiency by reducing photosystem II supercomplex and LHCII trimer stability. *Photosynth Res* 123: 157-165.

Schlicke H, Richter AS, Rothbart M, Brzezowski P, Hedtke B, Grimm B. 2015 Function of Tetrapyrroles, Regulation of Tetrapyrrole Metabolism and Methods for Analyses of Tetrapyrroles. *Procedia Chemistry* 14: 171-175.

Cortleven A, Marg I, Yamburenko MV, **Schlicke H**, Hill K, Grimm B, Schaller GE, Schmülling T, 2016 Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes, *Plant Physiol* 172: 464-478

Vorträge:

Schlicke H., Gläßer C., Grimm B. Exploring plastid signals derived from tetrapyrrole biosynthesis. Havel-Spree Colloquium. 7. Dezember 2012, Potsdam, Deutschland

Schlicke H, Hartwig AS, Gläßer C, Finkemeier I, Grimm B. Are there indications for tetrapyrrole-mediated signalling? International closing meeting of the research unit 804 "Retrograde Signaling in Plants". 13.-16.Oktober 2013, Kochel am See, Deutschland

Posterbeiträge:

Schlicke H., Grimm B. Exploring signals derived from the tetrapyrrole biosynthetic pathway. Havel-Spree Colloquium. 22. Februar 2011, Dabringhausen, Deutschland

Schlicke H., Hartwig AS, Firtzlaff V, Grimm B. Exploring signals derived from the tetrapyrrole biosynthetic pathway. International Conference On Tetrapyrrole Photoreceptors Of Photosynthetic Organisms (ICTPPO). 24. - 28. Juli 2011, Berlin, Deutschland

Schlicke H., Hartwig AS, Czarnecki O, Grimm B. Exploring plastid signals derived from tetrapyrrole biosynthesis. FEBS workshop - Plant Organellar Signaling from Algae to Higher Plants. 31. August - 3. September 2011, Primosten, Kroatien

Mitra M, Brzezowski P, Grovenstein P, **Schlicke H**, Wilson D, Gaston K, Lankford K, Smith J, Grimm B. Employing functional genomics to study the regulation of tetrapyrrole metabolism in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. 15th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas. 5. - 10. Juni 2012, Potsdam, Deutschland

Brzezowski P, **Schlicke H**, Niyogi K, Grimm B. Evaluation of Chlamydomonas mutants with defects in tetrapyrrole biosynthesis. 15th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas. 5. - 10. Juni 2012, Potsdam, Deutschland

1 Einleitung

Chlorophyll gehört zu den am häufigsten vorkommenden natürlichen Pigmenten. Es ist essentiell für die oxygene Photosynthese und damit auch für das Leben auf unserem Planeten wie wir es heute kennen. Schätzungen zu Folge werden im jährlichen Rhythmus 10^9 Tonnen Chlorophyll neu gebildet (Hendry *et al.*, 1987), ein Umsatz der sich sogar per Satellit aus dem Welall verfolgen lässt (Rüdiger, 1997). Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Chlorophyllbiosynthese und der Bedeutung von Mg-Porphyrinen, die wie Chlorophyll zu den Tetrapyrrolen zählen.

1.1 Die Stoffklasse der Tetrapyrrole

1.1.1 Bedeutung von Tetrapyrrolen

Tetrapyrrole gehören zu den Naturstoffen und kommen in allen Organismen vor. Sie spielen erdgeschichtlich eine entscheidende Rolle, da sie vermutlich schon Komponenten bei den ersten biochemischen Prozessen waren und somit essentiell für das Leben auf der Erde sind (Battersby *et al.*, 1980). So konnten erste Tetrapyrrole als sogenannte Geoporphyrine in über 3 Milliarden Jahre alten Fossilien nachgewiesen werden (Runge, 2000). Neben den natürlich vorkommenden Tetrapyrrolen erlangten vor allem synthetische Porphyrine in der Physik, Chemie und Medizin an Bedeutung. Abhängig von den spezifischen chemischen und physikalischen Eigenschaften erhalten diese Tetrapyrrole eine bestimmte Funktionalität und kommen u.a. in der Nanotechnologie (Monti *et al.*, 2008; Mhuircheartaigh *et al.*, 2011) und bei der Krebstherapie (Lange *et al.*, 1999) zum Einsatz.

Auch in der Natur ergeben sich aus einer Vielzahl von molekularen Unterschieden in der Struktur von Tetrapyrrolen unterschiedlichste Funktionen, die die Bedeutung dieser Moleküle unterstreichen. Als prosthetische Gruppen von Proteinen sind sie an verschiedensten biochemischen Abläufen beteiligt. Die beiden prominentesten Vertreter sind Häm und Chlorophyll. Für den Energiehaushalt einer Zelle ist Häm *c* als prosthetische Gruppe des Cytochrom *c* ein wesentlicher Bestandteil des respiratorischen Apparates. Als zyklische Tetrapyrrole mit einem zentralen Eisenatom gehören Häme zu den Kofaktoren der sauerstofftransportierenden und sauerstoffspeichernden Moleküle Hämoglobin und Myoglobin (Mense & Zhang, 2006). Viele Peroxidasen, Oxidasen und Katalasen besitzen Häm als prosthetische Gruppe und sind der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies

beteiligt (Caverzan *et al.*, 2012). Außerdem spielt Häm eine Rolle bei der Stickstofffixierung (Leong *et al.*, 1982). Weitere Vertreter der Tetrapyrrole sind beispielsweise Phytychromobilin und Sirohäm. Phytychromobilin gehört zu den linearen Tetrapyrrolen und ist als Chromophor Bestandteil des Photorezeptors Phytychrom. Sirohäm gehört zu den Kofaktoren von Nitrit- und Sulfitreduktasen (Avissar & Moberg, 1995). Als letztes Beispiel soll noch Coenzym B12 erwähnt werden. Als Kofaktor von Enzymen wie Isomerasen und Methyltransferasen ist es ein wichtiger Vertreter der Cobalamine, welche in allen Organismen vorkommen (Richter *et al.*, 2015). Chlorophyll übt als akzessorisches Pigment wichtige Funktionen in der für die Pflanzen, Cyanobakterien und Algen essentiellen oxygenen Photosynthese aus (Grimm, 1998). Außerdem bilden zwei Moleküle Chlorophyll *a* das sogenannte *special pair* und machen die Ladungstrennung im Photosystem II in dieser speziellen Anordnung erst möglich (Norris *et al.*, 1974).

Allein diese Beispiele machen die Komplexität der Bedeutung von Tetrapyrrolen offensichtlich. Dementsprechend sind auch viele wissenschaftliche Fragestellungen mit dieser Stoffgruppe verknüpft. Die Rolle von Porphyrinen aus dem Magnesium-Zweig (Mg-Zweig) der Tetrapyrrolbiosynthese (TPBS) bei der intrazellulären Signalgebung in Pflanzenzellen ist dabei ein sehr spezielles als auch interessantes und komplexes Gebiet der Grundlagenforschung, welches seit Jahrzehnten die wissenschaftliche Gemeinde beschäftigt und in dieser Arbeit untersucht wurde.

1.1.2 Struktur von Tetrapyrrolen

Die Vielzahl an möglichen Funktionen ist mit der hohen Diversität der chemischen Struktur der Tetrapyrrole verbunden. Tetrapyrrole kommen als lineare oder makrozyklische Moleküle vor. Dabei besitzen alle Tetrapyrrole vier Pyrrolringe, die über Methinbrücken verbunden sind. Jeder Pyrrolring besteht aus vier Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom. Im Zentrum des Tetrapyrrolrings können unterschiedliche Metallionen (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+}) über die Stickstoffatome im Komplex gebunden werden. Weiterhin können die Substituenten der Seitenketten und die Anzahl an konjugierten Doppelbindungen bei den verschiedenen Tetrapyrrolen variieren.

Chlorophyll, Häm und Sirohäm werden von Eukaryonten gebildet während Prokaryonten Bakteriochlorophyll, Corrinoide und das Coenzym F430 synthetisieren. Die Struktur der Klasse der Porphyrine, die im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit stehen, ist in der Abbildung 1 anhand des Protoporphyrin IX (Proto IX) dargestellt und zeichnet sich

ebenfalls durch die zyklische Anordnung von vier Pyrrolringen aus. Die Bezeichnung der Ringe mit den Buchstaben A bis D sowie die Nummerierung der Kohlenstoffatome wird beginnend am A-Ring im Uhrzeigersinn vorgenommen.

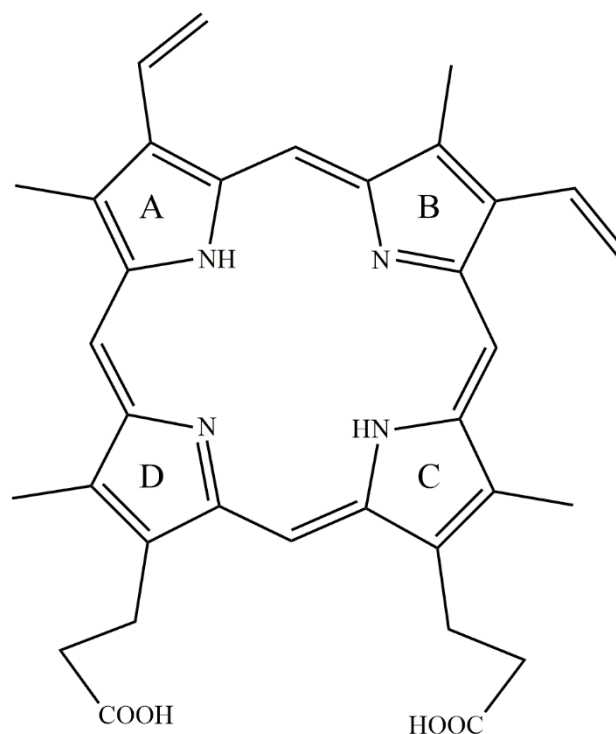


Abbildung 1: Darstellung des zyklischen Tetrapyrrolgrundgerüsts am Beispiel von Protoporphyrin IX.

So divergent die Tetrapyrrole in ihrer Struktur und ihren biologischen Funktionen sind, so konserviert sind große Teile der TPBS in fast allen Organismen. Im Folgenden werden die wichtigsten Grundzüge dieses Syntheseweges und dessen Regulation umrissen.

1.2 Die Tetrapyrrolbiosynthese

Die TPBS kann in unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden und ist an mehreren Stellen verzweigt. Nachfolgend soll hauptsächlich auf die für die Interpretation der erzeugten Ergebnisse relevanten Komponenten eingegangen werden (Abbildung 2). Für detailliertere Beschreibungen der hier nur angerissenen Enzymschritte kann auf ausführliche Zusammenfassungen der TPBS zurückgegriffen werden (Tanaka & Tanaka, 2007; Mochizuki *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2011). In dem ersten ratenlimitierenden Abschnitt erfolgt die Synthese der 5-Aminolävulinsäure (ALA). Der zweite Teil beschreibt die Bildung

des photoaktiven Tetrapyrrols Proto IX durch die Kondensation von acht Molekülen ALA. Hiernach teilt sich der Syntheseweg in den Mg-Zweig und den Eisen-Zweig (Fe-Zweig) der TPBS. Die Insertion des Metallkations Fe^{2+} in Proto IX führt zur Bildung von Häm und Phytychromobilin. Die initiale Insertion von Mg^{2+} in Protoporphyrin IX (Proto IX) im Mg-Zweig mündet in der Synthese von Chlorophyll. Weiterhin gehen Sirohäme, Biline und Corrinoide aus der TPBS hervor (Grimm, 1998). Alle Enzymschritte der stark konservierten TPBS finden in Pflanzenzellen in den Plastiden statt. Die an den Katalysen beteiligten Proteine können dabei löslich im Stroma oder an Membranen assoziiert bzw. gebunden vorliegen (Reinbothe *et al.*, 1996).

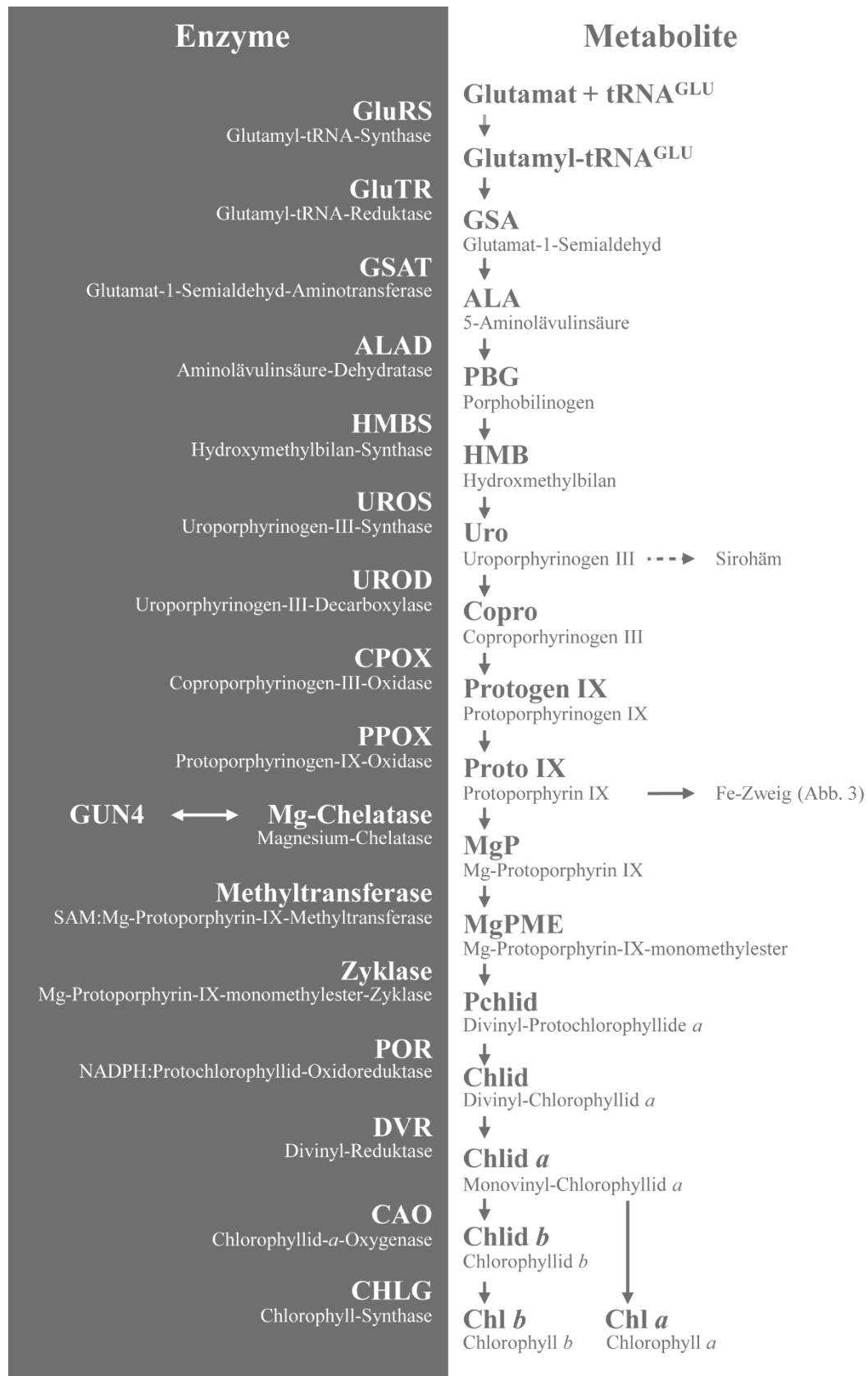


Abbildung 2: Überblick über die Enzyme (links) und Metabolite (rechts) der Chlorophyllbiosynthese. GUN4 ist ein positiver Regulator der Mg-Chelatase. SAM: S-Adenosyl-L-methionin. NADPH: Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

1.2.1 Die Synthese der 5-Aminolävulinsäure

Es wird zwischen dem C5- und dem Shemin-Weg zur Bildung von ALA unterschieden. So ist der phylogenetische Ursprung der ALA-Synthese, bei Pflanzen, Algen, Moosen und Farnen, auf der einen, sowie Menschen, Tieren, Pilzen und α -Proteobakterien, auf der anderen Seite, verschieden. Der Shemin-Weg ist auf α -Proteobakterien zurückzuführen. Die in den Mitochondrien lokalisierte ALA-Synthase kondensiert hierbei die Aminosäure Glycin und Succinyl-CoA zu ALA unter Freisetzung von Coenzym A (Shemin & Kikuchi, 1958). Der C5-Weg hat seinen Ursprung in photosynthetischen Bakterien z. B. Cyanobakterien und ist durch die Aminosäure Glutamat als Ausgangsprodukt gekennzeichnet (Tanaka *et al.*, 2011). Unter Beteiligung der Glutamyl-tRNA-Synthase (GluRS), der Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) und der Glutamat-1-semialdehyd-Aminotransferase (GSAT) wird in drei aufeinanderfolgenden Reaktionen aus Glutamat ALA gebildet (Abbildung 2). Glutamat wird dabei in der ersten Reaktion durch Bindung an die tRNA^{Glu} aktiviert (Hoover *et al.*, 1988) und reagiert weiter zu Glutamat-1-semialdehyd (Pontoppidan & Kannangara, 1994) und durch die abschließende Transaminierung zu ALA (Kannangara & Gough, 1978). Der eigentliche ratenlimitierende und regulatorisch interessante Schritt ist die Bildung von Glutamat-1-semialdehyd durch die GluTR. In *Arabidopsis* kodieren die drei Gene *AtHEMA1* (At1g58290), *AtHEMA2* (At1g09940) und *AtHEMA3* (At2g31250) für die Isoformen der GluTR. Dabei wird *AtHEMA1* als einziges der drei Gene vorwiegend in photosynthetisch aktiven Geweben exprimiert (Ilag *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1996).

1.2.2 Die Synthese von Protoporphyrin IX

Insgesamt acht Moleküle ALA kondensieren in den nächsten Schritten zu dem Tetrapyrrolmolekül Proto IX (Abbildung 2). Das Monopyrrol Porphobilinogen entsteht aus zwei Molekülen ALA (Nandi & Shemin, 1968) und wiederum vier Moleküle Porphobilinogen kondensieren zu dem linearen Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan (Battersby *et al.*, 1979). Die Umsetzung erfolgt durch die ALA-Dehydratase und die Hydroxymethylbilan-Synthase. Das gebildete instabile Hydroxymethylbilan wandelt sich spontan zum Uroporphyrinogen I um, das durch die Uroporphyrinogen-III-Synthase direkt zum zyklischen Uroporphyrinogen III umgewandelt wird (Battersby *et al.*, 1979). Uroporphyrinogen III ist am ersten Verzweigungspunkt der TPBS Substrat für die Synthese von Sirohäm und von Porphyrinen. Die nächsten Stoffwechselschritte im Porphyrinzwig der TPBS bis zur Bildung von Proto IX beinhalten Decarboxylierungen und Oxidationen

(Tanaka *et al.*, 2011). Der Reaktion der Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase folgt dabei die der Coproporphyrinogen-III-Oxidase (Seehra *et al.*, 1983; Ishikawa *et al.*, 2001). Mit der Bildung von Proto IX wird im letzten Schritt dieses Stoffwechselabschnitts durch die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase das Porphyringerüst mit seinem System aus konjugierten Doppelbindungen fertiggestellt (Poulson & Polglase, 1975; Jacobs & Jacobs, 1987).

Am zweiten Verzweigungspunkt der TPBS ist Proto IX Ausgangspunkt für die Biosynthese von Häm und Chlorophyll. Der erste Schritt des Fe-Zweigs als auch des Mg-Zweigs ist durch die Insertion eines Metallkations charakterisiert, wobei sich die beiden Enzyme Ferrochelatase (Fe-Chelatase) und Magnesium-Chelatase (Mg-Chelatase) stark voneinander unterscheiden.

1.2.3 Der Fe-Zweig

Zur Synthese von Häm und Bilinen (Abbildung 3) wird in einem ersten Schritt die Insertion von Fe^{2+} in Proto IX durch das monomere Enzym Fe-Chelatase katalysiert. Dabei werden keine weiteren Co-Faktoren oder Energiequellen als ATP benötigt (Brindley *et al.*, 2003; Cornah *et al.*, 2003). Es entsteht Häm *b*, das wiederum Substrat für die Synthese von Häm *a*, Häm *c* und Bilinen ist. Die Fe-Chelatase ist ein monomeres, membrangebundenes Protein (Matringe *et al.*, 1994) und kommt in Plastiden als auch in Mitochondrien vor (Little & Jones, 1976). In *Arabidopsis* gibt es zwei Isoformen, die unterschiedlich exprimiert und lokalisiert sind (Chow *et al.*, 1998). Die Expression von *AtFCII* (At2g30390) ist dabei auf photosynthetisch aktive Gewebe beschränkt (Singh *et al.*, 2002) und die Fe-Chelatase II kommt ausschließlich in Plastiden vor (Chow *et al.*, 1997). Dahingegen wird *AtFCI* (At5g26030) ubiquitär exprimiert (Smith *et al.*, 1994) wobei die Fe-Chelatase I sowohl Plastiden- als auch Mitochondrien-lokalisiert ist (Chow *et al.*, 1997).

Die Hämoxygenase katalysiert sauerstoff- und ferredoxinabhängig die Ringöffnung von Häm *b* unter Bildung von Biliverdin IX α , Kohlenstoffmonoxid und Fe^{2+} (Terry *et al.*, 2002). In *Arabidopsis* gibt es vier Isoformen *AtHO1*, *AtHO2*, *AtHO3* und *AtHO4* die unterschiedlich stark exprimiert werden (Matsumoto *et al.*, 2004). Die Hämoxygenase ist zusammen mit der Phytochromobilin-Synthase essentiell für die Bildung von Phytochromobilin, das als Chromophor Bestandteil von Photorezeptoren, wie Phytochromen, ist. Die Phytochromobilin-Synthase wird in *Arabidopsis* durch ein einzelnes Gen *AtHY2* kodiert (Kohchi *et al.*, 2001) und gehört zu der Familie der ferredoxinabhängigen Bilinreduktasen (Chiu *et al.*, 2010).

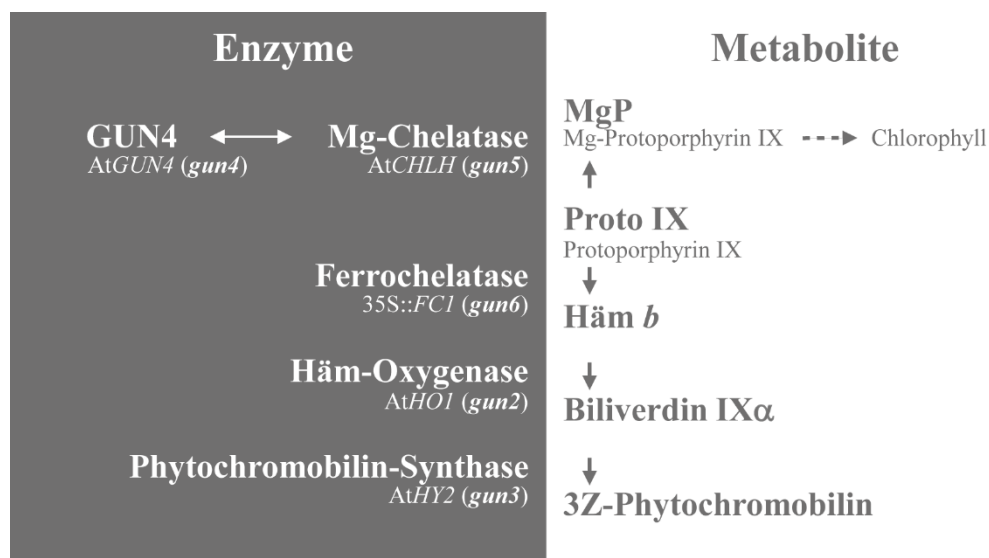


Abbildung 3 Überblick über die Enzyme (links) und Metabolite (rechts) der Häm- und Bilin-Biosynthese
 GUN4 ist ein positiver Regulator der Mg-Chelatase. In Klammern befinden sich die Bezeichnung der *gun*-Mutante sowie daneben das dazugehörige Gen bzw. Genotyp in *Arabidopsis*.

1.2.4 Der Mg-Zweig

Der Mg-Zweig der TPBS ist der letzte Abschnitt der Chlorophyllbiosynthese und beginnt mit der Insertion von Mg^{2+} durch das komplexe Enzym Mg-Chelatase. Es folgt eine Reihe von Modifikationen des Tetrapyrrolgerüsts. Das von der Mg-Chelatase gebildete Magnesium-Protoporphyrin IX (MgP) wird durch die Methyltransferase zu Magnesium-Protoporphyrin.-IX-Monomethylester (MgPME) umgewandelt. Die Ausbildung des isozyklischen Ringes unter Entstehung von Protochlorophyllid (Pchlid) wird durch die Magnesium-Protoporphyrin-IX-Monomethylester-Zyklase (Zyklase) katalysiert (Tanaka *et al.*, 2011). Die lichtabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) reduziert den Ring D des Pchlid was wiederum zur Bildung von Chlorophyllid (Chlid) führt (Apel *et al.*, 1980). Die Reduktion der Vinyl-Gruppe am Tetrapyrrolgerüst kann nicht eindeutig in diesen linearen Ablauf der Reaktionen eingeordnet werden, da die Divinyl-Reduktase (DVR) wahrscheinlich alle Porphyrinintermediate zwischen Proto IX und Chlid als Substrat akzeptiert (Tripathy & Rebeiz, 1988). Chlorophyll *a* entsteht schließlich durch die Esterbindung von Chlid und Phytol katalysiert durch die Chlorophyll-Synthase (von Wettstein *et al.*, 1995). Die Chlorophyll *a*-Oxygenase (CAO) wandelt die Methylgruppe am Ring B des Chlid zu einer Formylgruppe um (Schneegurt & Beale, 1992; Tanaka *et al.*, 1998; Oster *et al.*, 2000), was die Grundlage der Bildung von Chlorophyll *b* durch die Chlorophyll-Synthase ist.

Die Enzyme des Mg-Zweigs können durch Protein-Protein-Interaktionen in möglichen Multienzymkomplex organisiert sein, der unterstützt durch weitere Proteine eine höhere Aktivität der Enzyme und eine effizientere Weiterleitung der Intermediate ermöglicht. Die katalytische Untereinheit CHLH der Mg-Chelatase interagiert beispielsweise mit der Methyltransferase (Hinchigeri *et al.*, 1997; Alawady & Grimm, 2005; Shepherd *et al.*, 2005) und GUN4 (Larkin *et al.*, 2003; Adhikari *et al.*, 2009; Peter & Grimm, 2009).

Die folgenden 3 Kapitel beschäftigen sich etwas genauer mit den Enzymen Mg-Chelatase, Methyltransferase und Zyklase. Die Untersuchung der Beeinträchtigung dieser Enzyme und die daraus resultierenden physiologischen Konsequenzen sind Gegenstand dieser Arbeit.

1.2.4.1 Die Magnesium-Chelatase

Die Mg-Chelatase ist ein multimeres Enzym und besteht aus drei Untereinheiten. In *Arabidopsis* sind die Untereinheiten durch die Gene *AtCHLH* (At5g13630), *AtCHLD* (At1g08520) sowie *AtCHLI* (At4g18480) und *AtCHLI2* (At5g45930) kodiert. Die Untereinheiten der Mg-Chelatase CHLH, CHLD und CHLI haben ein ungefähres Molekulargewicht von 140 kDa, 70 kDa und 40 kDa (Tanaka & Tanaka, 2007). Die von der Mg-Chelatase-vermittelte Insertion des Mg^{2+} in Proto IX ist ATP-abhängig und kann in zwei Schritte unterteilt werden (Walker & Willows, 1997). Im ersten Schritt bildet sich ein Komplex aus ATP, Mg^{2+} sowie CHLD und CHLI. Dabei bildet CHLD eine hexamere Ringstruktur aus und interagiert mit dem CHLI-Hexamer (Tanaka *et al.*, 2011). In einem zweiten Schritt bindet dieser Komplex an den CHLH-Proto IX-Komplex und unter der hydrolytischen Spaltung von ATP wird das Kation Mg^{2+} in den Tetrapyrrolring inseriert und MgP gebildet (Walker & Willows, 1997). Für die Synthese des Mg-Porphyrins MgP sind dabei alle drei Untereinheiten der Mg-Chelatase essentiell, was Untersuchungen an Mutanten dieser Gene belegen (Mochizuki *et al.*, 2001; Rissler *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Die erste Reaktion im Mg-Zweig der TPBS ist gleichzeitig der erste Schritt der nicht mehr im Stroma stattfindet, sondern Membran-assoziiert (Walker & Willows, 1997).

1.2.4.2 Die Magnesium-Protoporphyrin-IX-Methyltransferase

Die Methyltransferase gehört zu der großen Familie der S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen Methyltransferasen (Kagan & Clarke, 1994) und wird in *Arabidopsis* durch ein einzelnes Gen, *AtCHLM* (At4g25080), kodiert (Block *et al.*, 2002). Die Methyltransferase katalysiert den Transfer einer Methylgruppe von SAM auf die Carboxygruppe der C13-

Propionatseitenkette des MgP. Der mehrstufige Reaktionsmechanismus zur Bildung von MgPME ist durch die Bildung eines Intermediates gekennzeichnet (Shepherd & Hunter, 2004). Genau wie die anderen Enzyme des Mg-Zweigs der TPBS ist CHLM essentiell für die Bildung von Chlorophyll sowie der Assemblierung der Photosysteme und des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes (Pontier *et al.*, 2007). Die Methyltransferase zeigt eine duale Lokalisation in der Thylakoidmembran und der Chloroplastenhüllmembran (Block *et al.*, 2002).

1.2.4.3 Die oxidative Magnesium-Protoporphyrin-IX-Monomethylester-Zyklase

Die Zyklase katalysiert die sauerstoffabhängige Bildung von Pchlid aus MgPME. Bei dieser oxidativen Zyklisierung wird der für Chlorophyll charakteristische fünfte Ring ausgebildet. In photosynthetisch aktiven Organismen sind zwei verschiedene Mechanismen der Zyklisierungsreaktion bekannt, die von zwei unterschiedlichen Zyklase-Typen katalysiert werden (Tanaka *et al.*, 2011). Bei der Katalyse unter anaeroben Bedingungen fügt die Zyklase atomaren Sauerstoff aus Wasser in MgPME ein (Porra *et al.*, 1995). Demgegenüber steht die Katalyse von MgPME in einer dreistufigen Reaktion (Porra *et al.*, 1996), bei der der atomare Sauerstoff aus molekularem Sauerstoff stammt (Pinta *et al.*, 2002). Aerobe photosynthetisch aktive Organismen wie höhere Pflanzen enthalten diesen aeroben-Oxygenase-Typ einer Zyklase. In *Arabidopsis* wird die katalytische membrangebundene Untereinheit der Zyklase durch AtCHL27 (At3g56940) kodiert. Es gibt allerdings schon lange Hinweise darauf, dass weitere Untereinheiten für die Bildung von Pchlid benötigt werden (Walker *et al.*, 1991; von Wettstein *et al.*, 1995). Inzwischen konnten in Tabak mit dem membrangebundenen Protein LCAA (Albus *et al.*, 2012) und in Cyanobakterien mit YCF54 (Hollingshead *et al.*, 2012) eine weitere homologe Komponente der Zyklase-Reaktion gefunden werden.

1.2.5 Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese

Pflanzen sind einer Vielzahl von Umweltreizen ausgesetzt. Dabei spielen biotische und abiotische Faktoren gleichermaßen eine wichtige Rolle. Die Perzeption dieser Reize und eine entsprechende Anpassung an die veränderten Bedingungen finden auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Ebenen statt. Abhängig von dem Entwicklungsstand und dem Gewebe findet nochmals eine Differenzierung der Regulation statt. Auf diese Weise wird eine spezifische Anpassung, beispielsweise durch Änderungen der Expression von Genen der TPBS, gewährleistet, was als transkriptionelle Regulation bezeichnet wird.

Demgegenüber steht die posttranslationale Kontrolle, bei der, z. B. abhängig vom Redox- und Phosphorylierungszustand, Enzymaktivitäten reguliert werden.

1.2.5.1 Transkriptionelle Kontrolle von Genen der TPBS

Eine koordinierte Genexpression ist die Grundlage für eine optimale Synchronisation der Biosynthese von Chlorophyllen und photosyntheseassoziierten Proteinen. Die Gene der TPBS können abhängig von ihren Expressionsprofilen in vier Cluster eingeteilt werden (Matsumoto *et al.*, 2004). So ist beispielsweise die Expression der Gene *AtHEMAL*, *AtCHLH*, *AtCHL27* und *AtCAO*, die für die GluTR, die Untereinheit CHLH der Mg-Chelatase, die Zyklase und die CAO kodieren, stark von Licht und der endogenen Uhr beeinflusst (Matsumoto *et al.*, 2004).

Der Transkriptionsfaktor HY5 (LONG HYPOCOTYL-5) reagiert auf rot- und blaulichtvermittelte Signale und wird im Dunkeln von COP1 proteolytisch abgebaut (Cluis *et al.*, 2004), was zu einer Repression der Expression lichtinduzierter Gene der TPBS führt (McCormac & Terry, 2002). Zu diesen Genen gehören z.B. *AtGluRS*, *AtCHLH*, *AtGUN4*, *AtCHL27* und *AtCAO*.

Die Proteine der PIF Familie (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR) gehören zu den negativen Regulatoren der lichtabhängigen Chloroplastenbiogenese, wobei PIF1 und PIF3 direkt an der transkriptionellen Kontrolle vieler Gene der TPBS, wie der *AtFCII* und der *AtHO3*, beteiligt sind (Huq *et al.*, 2004; Castillon *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2008).

Die Transkriptionsfaktoren GLK1 und GLK2 (GOLDEN-LIKE) sind ebenfalls an der lichtabhängigen Kontrolle der Expression von TPBS Genen wie z.B. *AtCHL27* und *AtPORB* beteiligt (Waters *et al.*, 2009).

Während der Skotomorphogenese ist die Regulation der Expression von Genen der TPBS vorwiegend durch verschiedene Phytohormone reguliert. Ethylen stimuliert, vermittelt durch den Transkriptionsfaktor EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3), die Expression von *AtPORA* und *AtPORB* in etiolierten Keimlingen (Zhong *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2014). Die Applikation von Cytokinin induziert unter anderem die photomorphogene Entwicklung der Pflanzen im Dunkeln, was folglich auch die Expression Gene der TPBS betrifft (Hedtko *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2014). Auxin als Gegenspieler zum Cytokinin beeinflusst wiederum diesen Prozess vermittelt durch AUX/IAA-Faktoren (Tian *et al.*, 2002; Hedtko *et*

al., 2012; Kobayashi *et al.*, 2012). Gibberellin beeinflusst u.a. die Akkumulation von Chlorophyll während der Deetiolierung (Alabadi *et al.*, 2008) und den proteolytischen Abbau von HY5 (Cheminant *et al.*, 2011).

1.2.5.2 Redoxregulation von Enzymen der TPBS

Ein weiterer posttranslationaler Mechanismus der Regulation von Stabilität und Aktivität von Enzymen basiert auf dem Redoxzustand dieser Proteine. Die Aminosäure Cystein besitzt Seitengruppen, die in einem oxidierten oder reduzierten Zustand vorliegen können. Abhängig vom Redoxzustand kann sich so die Tertiärstruktur von Proteinen ändern und die Enzymaktivität beeinflusst werden. In höheren Pflanzen gibt es in den Plastiden zwei verschiedene Mechanismen, die die Redoxkontrolle der TPBS vermitteln. Die lichtabhängigen Thioredoxine (TRX) stehen dabei den lichtunabhängigen NADPH-abhängigen-Thioredoxin-Reduktasen (NTR) gegenüber (Brzezowski *et al.*, 2015).

Die TRX Proteine werden vermittelt über die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase mit Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette reduziert (Lemaire *et al.*, 2007; Hanke & Mulo, 2013). Die Genfamilie besteht aus 10 Mitgliedern die abhängig von ihrer Struktur, Lokalisation und den Zielproteinen unterschiedlichen Untergruppen zugeordnet werden können (Serrato *et al.*, 2013). TRXf und TRXm interagieren auch mit Enzymen der frühen Reaktionsschritte der TPBS, wie GSAT, ALAD, UROD, PPOX, aber auch der CHLI Untereinheit der Mg-Chelatase. Alle Enzyme verfügen über konservierte Cysteine (Balmer *et al.*, 2003; Marchand *et al.*, 2006). Eine mögliche Rolle von NTRC bei der Regulation der CHLI-Aktivität konnte noch nicht abschließend belegt werden (Stenbaek & Jensen, 2010; Luo *et al.*, 2012; Perez-Ruiz *et al.*, 2014).

Die Mitglieder der Proteinfamilien NTRA und NTRB befinden sich in den Mitochondrien und dem Cytosol während NTRC Proteine ausschließlich in den Chloroplasten lokalisiert sind (Serrato *et al.*, 2004; Perez-Ruiz *et al.*, 2006). Auch strukturell und funktionell unterscheidet sich NTRC von den anderen beiden NTR's. So kann sich NTRC selbst an seiner TRX Domäne reduzieren (Perez-Ruiz & Cejudo, 2009). Zusammen mit den verschiedenen Isoformen der Thioredoxine spielt NTRC eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung eines konstanten Metabolitflusses der TPBS und gewährleistet so die Funktionalität chlorophyll- und hämabhängiger Prozesse in der Pflanzenzelle (Lepisto *et al.*, 2009; Richter & Grimm, 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass NTRC an der Redoxregulation von GluTR, CHLM und POR beteiligt ist (Serrato *et al.*, 2004; Lepisto *et al.*, 2009; Richter & Grimm, 2013). So sind die Proteingehalte dieser Enzyme in der *ntrc*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Darüber hinaus interagiert NTRC mit GluTR *in vivo* (Richter & Grimm, 2013), was die Rolle von NTRC an der Regulation der ALA Biosynthese unterstreicht. Die Methyltransferase verfügt über konservierte Cysteine und ändert abhängig vom Redoxzustand die Proteinkonformation, wodurch die Stabilität und Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflusst werden (Richter *et al.*, 2013).

1.2.5.3 Phosphorylierung von Enzymen der TPBS

Die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen spielt bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse eine wesentliche Rolle. Dabei werden Aminosäuren wie Serin und Threonin phosphoryliert und mit einer negativen Ladung versehen, was zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des entsprechenden Proteins führt. Dabei ändern sich die biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Proteine, was in einer veränderten Stabilität und Aktivität der Enzyme resultiert oder Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflusst. Die bisher bekannten 294 plastidären Proteine, die Ziele phosphorylierungsabhängiger Regulationen sind, fungieren in verschiedenen intraplastidären Prozessen (Baginsky & Gruissem, 2009; Schonberg & Baginsky, 2012). So wurden auch Phosphorylierungsstellen in Enzymen der TPBS identifiziert. Neben Enzymen der ALA-Synthese wie GSAT wurde auch bei Enzymen des Mg-Zweigs der TPBS entsprechende Phosphorylierungsstellen identifiziert. Die Untereinheiten der Mg-Chelatase CHLH und CHLI sowie GUN4, DVR und PORB gehören zu potentiellen Kandidaten, die über Phosphorylierung reguliert werden (Brzezowski *et al.*, 2015). Es wird vermutet, dass der *feed-forward* (Hedtke *et al.*, 2007) und *feed-back* (Papenbrock *et al.*, 2000) Mechanismus zwischen der ALA-Synthese und den Enzymen des Mg-Zweigs der TPBS ebenfalls über Phosphorylierung von Proteinen realisiert wird (Brzezowski *et al.*, 2015). So kann eine schnelle Anpassung des Metabolitflusses als Antwort auf wechselnde Umweltbedingungen gewährleistet werden, was über die transkriptionelle Kontrolle der nuklearen Genexpression in dieser Form nicht möglich ist.

1.3 Retrograde Signalgebung zwischen Plastiden und Zellkern

Die Endosymbiontentheorie bietet eine Erklärung für die genetische Heterogenität von photosynthetisierenden Organismen. Freilebende cyanobakterielle Vorfahren wurden von einer Wirtszelle aufgenommen und entwickelten sich im Zuge der Symbiose zu Organellen

wie Plastiden, welche eine entscheidende Rolle für den Energiehaushalt einer Zelle einnehmen (Martin *et al.*, 2002; Nott *et al.*, 2006). Der Großteil der Gene, die für die ca. 3000 Proteine des Plastiden kodieren, ist im Zellkern lokalisiert. Die wenigen in den Plastiden selbst lokalisierten Gene kodieren für Proteine des Photosyntheseapparates, der organellären Genexpression und der Proteinsynthese (Leister, 2005; Joyard *et al.*, 2009). Für die Koordination der Expression von Kerngenen und Plastidengen und zur Sicherstellung der Funktionalität der Plastiden bedarf es eines bidirektionalen Austausches von Informationen zwischen den beteiligten Organellen. Die Plastiden stehen dabei unter anterograder Kontrolle des Zellkerns, wohingegen die Expression kernkodierter Gene durch retrograde Signale, ausgehend von den Plastiden, reguliert wird.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Daten erzeugt, die zur Aufklärung retrograder Signalwege beitragen sollen. Diese sind teilweise auf sehr unterschiedliche Art zusammengefasst und interpretiert worden (Beck, 2005; Pogson *et al.*, 2008; Kleine *et al.*, 2009; Chi *et al.*, 2013; Busch & Montgomery, 2015; Chan *et al.*, 2015).

Es werden abhängig von der Quelle der Signale in den Chloroplasten verschiedene Signalwege definiert. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Singulett Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), gehören zu möglichen Signalmolekülen (op den Camp *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004; Mullineaux *et al.*, 2006). Veränderungen von Gehalten bestimmter Metabolite der Plastiden können ebenfalls Ursprung einer retrograden Signalgebung sein (Baier *et al.*, 2004; Rolland *et al.*, 2006). Auch Intermediate der TPBS sowie der Carotenoid-Biosynthese werden als Signalmoleküle diskutiert (Oelmüller & Mohr, 1986; Susek *et al.*, 1993; Mochizuki *et al.*, 2001; Woodson *et al.*, 2011). Darüber hinaus kann ein Plastidensignal von der Proteinsynthese innerhalb der Chloroplasten ausgehen (Oelmüller *et al.*, 1986; Gray *et al.*, 2003; Voigt *et al.*, 2010) oder über den plastidären Redoxzustand von Komponenten der Photosysteme generiert werden (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Baier & Dietz, 2005; Fey *et al.*, 2005).

Für die spätere Diskussion ist es wichtig zwei weitere Klassifikationen vorzunehmen. Abhängig von dem Entwicklungsstand der Plastiden wird zwischen der *biogenic control* und der *operational control* unterschieden (Pogson *et al.*, 2008). Die *biogenic control* umfasst dabei Prozesse der frühen Chloroplastenentwicklung. Eine wesentliche Rolle spielt hier die plastidäre Genexpression sowie die Assemblierung des Photosyntheseapparates, was mit der

Biosynthese von Proteinen und Pigmenten einhergeht und den Wechsel von einer heterotrophen zu einer photoautotrophen Lebensweise der Pflanzenkeimlinge ermöglicht. Die *operational control* fasst retrograde Signale zusammen, die im fertig ausgebildeten funktionalen Chloroplasten entstehen und während sich stetig wechselnder Umweltbedingungen zur Anpassung des chloroplastidären Status beitragen. Dabei können Kerngene reguliert werden, die Einfluß auf die Stöchiometrie der Photosysteme haben oder Antworten auf Stress auslösen (Pogson *et al.*, 2008). Die plastidären retrograden Signalwege sind dabei Teil eines Signalnetzwerks, das als Antwort auf biotische und abiotische Reize simultan auf die Expression von Kerngenen einwirkt (Jung & Chory, 2010). Als Resultat verschiedenster Stressantworten wie Trockenheit oder Starklicht ergeben sich abhängig vom Entwicklungszustand der Pflanze unterschiedliche Quellen für die Entstehung retrograder Signale. Die TPBS wird dabei als ein Ursprung für retrograde Signale diskutiert, wobei die Porphyrine des Mg-Zweigs der TPBS eine wichtige Rolle zugesprochen wird (Terry & Smith, 2013).

1.3.1 Signale aus der TPBS

Erste Hinweise darauf, dass Intermediate der TPBS als plastidäre Signale die Expression kernkodierter Gene regulieren, stammen von Untersuchungen mit *C. reinhardtii* aus dem Jahre 1984 (Johanningmeier & Howell, 1984). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass MgP und MgPME die lichtinduzierte Akkumulation der mRNA von *LHCP* (*LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN*) inhibiert (Johanningmeier & Howell, 1984). Aus dem gleichen Jahr stammen weitere Hinweise darauf, dass die NGE durch Plastidensignale reguliert wird. Maispflanzen mit einer Beeinträchtigung der Carotenoid-Biosynthese akkumulieren ebenfalls keine *LHCP*-Transkripte (Mayfield & Taylor, 1984). Weiterhin haben diese Pflanzen photooxidativen Stress, der durch Behandlung mit Norflurazon (NF) nachgestellt werden kann (Mayfield *et al.*, 1986). Die Behandlung mit NF, einem kompetitiver Inhibitor der Carotenoid-Biosynthese, führt zur Photooxidation der Thylakoidmembran. Daraus resultiert die Beeinträchtigung der Chloroplasten-Biogenese was schließlich zu nichtfunktionalen Chloroplasten führt (Strand *et al.*, 2003). Diese generieren wiederum Signale, die zu einer Verminderung der Expression von Kerngenen führt, die für plastidenlokalisierte Proteine kodieren (Oelmüller & Mohr, 1986; La Rocca *et al.*, 2001). Mutanten, die dazu nicht mehr in der Lage sind, werden als *genomes uncoupled*-Mutanten (*gun1* bis *gun6*) beschrieben. Nach Behandlung mit NF

kommt es in den *gun*-Mutanten zu einer weniger starken Repression der Expression von beispielsweise *LHCB* und *RBCS* (RUBISCO SMALL SUBUNIT) im Vergleich zum Wildtyp. Diese Gene gehören zu den *photosynthesis-associated nuclear genes* (PhANGs) und gehören zu den Referenzgenen für TP-vermittelte retrograde Signale (Susek *et al.*, 1993; Mochizuki *et al.*, 2001; Rodermeier, 2001).

GUN1 ist ein plastidenlokalisiertes pentatricopeptid-repeat Protein und zudem eine generelle Schnittstelle für Chloroplastensignale. Es vermittelt über den Transkriptionsfaktor ABI4 (ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4) die Repression photosynthetischer Gene im Zellkern (Koussevitzky *et al.*, 2007). Eine direkte Verbindung zu retrograden Signalen aus der TPBS konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Mochizuki *et al.*, 2001). *GUN2* und *GUN3* kodieren für die Häm-Oxygenase (Davis *et al.*, 1999; Muramoto *et al.*, 1999) bzw. die Phytychromobilin-Synthase (Kohchi *et al.*, 2001). Die Mutanten *gun2* und *gun3* wurden ursprünglich als *long hypocotyl hy1* und *hy2* beschrieben (Vinti *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2001). Die Blätter dieser Pflanzen sind im Vergleich zum Wildtyp hellgrün und die Keimlinge zeigen ein verlängertes Hypocotyl. Das Gen *GUN4* kodiert für ein Protein, dem eine Vielzahl von Funktionen in der Kontrolle der Mg-Chelatase zugeschrieben wird. Neben dem Einfluß auf die Mg-Chelatase-Reaktion kann GUN4 erhöhte Konzentrationen von Proto IX wahrnehmen, indem es Proto IX bindet und somit direkt auf ROS-vermittelte retrograde Signale einwirkt (Brzezowski *et al.*, 2014). Die Mutation in der *gun5*-Mutante wurde in dem Gen gefunden, das für die katalytische Untereinheit der Mg-Chelatase, CHLH, kodiert (Kapitel 1.2.4.1). Transgene *Arabidopsis* Pflanzen, die das Gen *AtFCI* überexprimieren, zeigen eine verstärkte Expression von PhANGs und werden als *gun6-ID*-Mutante beschrieben (Woodson *et al.*, 2011). Bis auf GUN1 sind alle Proteine direkt mit der TPBS assoziiert (Abbildung 3). Auch wenn die Mechanismen der retrograden Signalübertragung noch nicht aufgeklärt sind, deuten diese Erkenntnisse auf eine Schlüsselrolle der TPBS bei der Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern hin.

1.3.2 Porphyrine als retrograde Signale

Die ersten Hinweise, dass Proto IX, MgP und MgPME als retrograde Signale an der Regulation der Expression von Kerngenen beteiligt sind, stammen aus Untersuchungen von Pflanzen, die mit TPBS-Inhibitoren behandelt wurden (Johanningmeier & Howell, 1984; Oster *et al.*, 1996; La Rocca *et al.*, 2001; Strand *et al.*, 2003). Erkenntnisse aus Experimenten mit *gun*-Mutanten oder Fütterungsexperimenten mit Porphyrinen (Susek *et al.*, 1993; Kropat

et al., 1997; La Rocca *et al.*, 2001; Mochizuki *et al.*, 2001; Strand *et al.*, 2003) ließen Rückschlüsse zu, dass Porphyrine als Signalmoleküle des Chloroplasten in Frage kommen. Mit LAF6 wurde ein Protein gefunden, das als potentieller Transporter von Proto IX in das Stroma vorgeschlagen wurde (Moller *et al.*, 2001). Untersuchungen der Mutante *laf6* zeigten weiterhin, dass eine Akkumulation von Proto IX als negatives Signal die Kerngenexpression (NGE, *nuclear gene expression*) beeinflusst. Demgegenüber stehen Erkenntnisse aus Versuchen zur lichtinduzierten Expression von Kerngenen, dass Intermediate der TPBS positive Signale bezüglich der Kernexpression sind (Kropat *et al.*, 1997; Kropat *et al.*, 2000). Im Dunkeln gewachsene *C. reinhardtii* Kulturen zeigten nach Zugabe von MgP und MgPME eine Induktion der Expression von *HSP70*-Genen (Kropat *et al.*, 1997). Weiterhin konnten Promotorregionen des *HSP70A*-Gens identifiziert werden, die spezifisch auf Tetrapyrrole reagieren (von Gromoff *et al.*, 2006; von Gromoff *et al.*, 2008).

Den frühen Erkenntnissen zur TP-vermittelten Regulation der NGE stehen Untersuchungen aus den letzten Jahren entgegen, bei denen sensitivere und präzisere Methoden zur Bestimmung der *steady state*-Gehalte von Intermediaten der TPBS genauere Rückschlüsse auf die Rolle von Porphyrinen bei der retrograden Signalgebung des Chloroplasten zulassen. Es gibt Studien, die keinen Zusammenhang zwischen den Gehalten an Mg-Porphyrinen und der Expression PhANGs zeigen (Mochizuki *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2008). Weiterhin müssen Ergebnisse aus Untersuchungen von *knock-out*-Mutanten oder Herbizid-behandlungen kritisch hinterfragt werden. In der *chlm*-Mutante wurden erhöhte Gehalte an MgP für eine Repression der *LHCB* Expression verantwortlich gemacht (Pontier *et al.*, 2007). Versuche mit NF kombiniert mit der Fütterung von ALA führten zu einer Akkumulation von MgP und MgPME im Cytosol (Ankele *et al.*, 2007). In beiden Fällen ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass pleiotrope Effekte und nicht die direkte Wirkung der Porphyrine einen Einfluss auf die Expression von Kerngenen hatten. Aufgrund der photoaktiven Eigenschaften von MgP und MgPME kann bei Licht von erhöhten Gehalten an ROS ausgegangen werden, die in großen Mengen zu einer Schädigung der Membranlipide führen können und im Fall der NF-Behandlung, die Chloroplasten durchlässig für Porphyrine gemacht hat (Strand *et al.*, 2003). Weiterhin konnten nach der Behandlung mit NF ohne zusätzliche Fütterung von ALA keine erhöhten bzw. sogar reduzierte Gehalte an Porphyrinen gemessen werden (Mochizuki *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen stehen im Einklang damit, dass nach der NF-Behandlung die Expression

vieler Gene für Enzyme der TPBS reduziert ist (Moulin *et al.*, 2008). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde spekuliert, ob nicht auch hier eher von einer Wirkung unterschiedlicher *steady state*-Gehalte von Intermediaten der TPBS auf den plastidären Redoxzustand oder der ROS-vermittelten Signalgebung auszugehen ist (Moulin *et al.*, 2008).

1.4 Zielstellung

Das Wissen über die Rolle von Porphyrinen und Mg-Porphyrinen als Auslöser für retrograde Signalwege zwischen Chloroplasten und Zellkern stammt im Wesentlichen von experimentellen Ansätzen mit Herbiziden wie Norflurazon oder der Analyse von Mutanten (Strand *et al.*, 2003; Woodson *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse sind oft im Kontext von Studien zur Chloroplastenbiogenese unter der Nutzung von wenige Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen erzeugt worden, deren Blätter noch nicht photosynthetisch aktiv waren. In diesem Entwicklungsstadium der Keimlinge zielten die Untersuchungen zur intrazellulären Kommunikation auf die *biogenic control* ab (Kapitel 1.3).

In wie weit die Funktion von Metaboliten der Chlorophyllbiosynthese als retrograde Signale auch auf bis zu drei Wochen alte *Arabidopsis*-Keimlinge mit voll ausgebildeten funktionalen Chloroplasten übertragbar ist, soll mit dieser Arbeit geklärt werden. In diesem Stadium ist eine *operational control* erforderlich (Kapitel 1.3), also ein permanenter Informationsaustausch zwischen den Chloroplasten und dem Zellkern. Ob und in welchem Umfang Signale aus der TPBS kontinuierlich den Status des Syntheseweges kommunizieren und gegebenenfalls entsprechende Anpassungen der NGE auslösen sollte mit dieser vorliegenden Arbeit geprüft werden. Es wurde ein experimenteller Ansatz für die Untersuchung von TP-vermittelten Änderungen der Expression von Kerngenen gewählt, bei dem der unmittelbare Einfluss von Änderungen der TPBS geprüft wurde. Zu diesem Zweck sollten transgene *Arabidopsis*-Linien mit einem induzierbaren RNAi-System für die Gene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* untersucht und charakterisiert werden, um die Auswirkungen der induzierten Geninaktivierung auf die NGE und mögliche pleiotrope Effekte zu studieren. Damit verlässlich die direkte Wirkung von Störungen der Chlorophyllbiosynthese und die Rolle der Metabolite des Syntheseweges nachgewiesen werden kann, sollte untersucht werden, ob in Folge der Geninaktivierung und verringerter Transkriptmengen dieser Zielgene reduzierte Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, Methyltransferase und Zyklase zu Veränderungen der *steady state*-Gehalte von Metaboliten des Mg-Zweigs der TPBS, wie Proto IX, MgP und MgPME, auftreten. Dies wären

Voraussetzungen für Veränderungen des Metabolitgehaltes der TPBS und somit einem potentiellen Signal zur Regulation der NGE. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten globale Analysen der Transkriptome der photosynthetisch aktiven Keimlinge der RNAi-Linien nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung durchgeführt werden, um durch die Veränderung der Aktivität je eines einzelnen Enzymschrittes im Mg-Zweig der TPBS unmittelbar deregulierte Gene zu identifizieren. Diese sollen dann als Ergebnis der modifizierten retrograden Signale infolge der Deregulation der Chlorophyll-Biosynthese verifiziert werden, um anschließend die mögliche Funktion des Genproduktes für die Antwort zu analysieren. In einer ersten Arbeitshypothese ist davon auszugehen, dass diese identifizierten Gene Funktionen in der intrazellulären Kommunikation oder in der Aufrechterhaltung funktionsfähiger Chloroplasten besitzen.

In einem zweiten Ansatz wurde das Ziel verfolgt, die Auswirkungen der Langzeitinduktion der Geninaktivierung auf die Expression von Photosynthese- und Tetrapyrrolbiosynthese-assoziierten Genen zu untersuchen. Dabei sollen Erkenntnisse über das Zusammenspiel verschiedener plastidärer retrograder Signalwege gewonnen werden. Zeitlich aufgelöste Analysen von Metaboliten der TPBS und Transkripten von PhANGs, TPBS Genen sowie ROS Markergenen über mehrere Tage sollten Hinweise auf retrograde Signale infolge der unmittelbaren oder indirekten Wirkung der Beeinträchtigungen einzelner Enzymschritte des Mg-Zweigs der TPBS geben. Zugrunde liegt dem die Arbeitshypothese, dass infolge des verringerten Metabolitflusses ein Mangel an Chlorophyll zu Veränderungen der Expression von PhANGs führt und die mögliche Akkumulation von Mg-Porphyrinen zur Bildung von beiträgt.

Letztlich sollten die Erkenntnisse dieser Arbeit einen Einblick in die Rolle von Metaboliten des Mg-Zweigs der Chlorophyllbiosynthese bei der Kommunikation zwischen intakten Chloroplasten und dem Zellkern gewähren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, wenn nicht anders beschrieben, den Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.a.) und wurden von den in Tabelle 1 gelisteten Firmen bezogen.

Tabelle 1: Übersicht von Herstellern der für diese Arbeit verwendeten Chemikalien.

| Substanzklasse | Firma |
|----------------------------|--|
| Chemikalien | Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE) |
| Chemikalien | AppliChem GmbH (Darmstadt, DE) |
| Feinchemikalien | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE) |
| Feinchemikalien | GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, DE) |
| Enzyme und Größenstandards | Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) |
| Enzyme und Größenstandards | New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, DE) |
| Enzyme und Größenstandards | Bioline GmbH (Luckenwalde, DE) |
| | Life Technologies (Darmstadt, DE) |
| | Merck (Darmstadt, DE) |
| Standards | Frontier Scientific (Logan, USA) |
| Zusätze für Nährmedien | DUCHEFA Biochemie B.V. (Haarlem, NL) |

2.2 Geräte

Die benutzten Geräte und Hilfsmittel entsprachen der allgemeinen Ausstattung eines molekularbiologischen Labors (z.B. Pipetten, Zentrifugen, Heizblöcke, pH-Meter, Gelelektrophorese-Zubehör und sterile Werkbänke). Des Weiteren wurden bei der Durchführung der Experimente die in Tabelle 2 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2: Zusammenstellung von Geräten, die bei dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

| Bezeichnung | Typ | Hersteller |
|--------------------------|---|--|
| Agarosegelelektrophorese | SUB Cell GT mit Powerpac 300 | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| Anzuchtschrank | MobyLux GroBank BB-XXL ₃ & BB-XXL ₃ ⁺ | CLF Plant Climatics GmbH (Wertingen, DE) |
| CCD-Kamera | stella 3200 | raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, DE) |
| Gefriertrocknungsanlage | | Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, DE) |
| Geldokumentationssystem | Alpha Imager | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| HPLC | 1100/1290 Series | Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis, (Waldbronn, DE) |
| Electroporator | MicroPulser™ | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| NanoDrop | NanoDrop®2000 | Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) |
| Real-time PCR | CFX96 Touch™ | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| Schwingmühle | MM301 | Retsch GmbH (Haan, DE) |
| Semidry Blotter | Trans-Blot® SD Cell | Bio-Rad (Hercules, USA) |
| Spectrophotometer | Ultrospec 3300 pro | GE Healthcare (Uppsala, Swe) |
| Sterilbank | Lamin Air® | Heraeus (Osterode am Harz, DE) |
| | Lamina Airflow Workstation, | Integra Biosciences (Zizers, CH) |
| Thermocycler | T3 und Tpersonal | Biometra (Göttingen, DE) |
| Zentrifuge | Biofuge fresco | Thermo Fischer Scientific, (Waltham, USA) |
| | Centrifuge 5424 | Eppendorf (Hamburg, DE) |
| | Avanti J-26 XP (fixed angle: JA10,JLA16250, JA 30.50, swing-out: JS 24) | Beckman Coulter (Brea, USA) |
| | Rotina 35R/38R | Hettich (Bäch, CH) |

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Pflanzen - Anzuchtbedingungen, Behandlung und Probenvorbereitung

Zur Erzeugung transgener *Arabidopsis* RNAi-Linien und für alle durchgeführten Experimente wurden Pflanzen des *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Ökotyps Columbia-0 (Col-0) eingesetzt. Die Keimlinge wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Erde (Einheitserde Typ GS90 / Vermiculit, 3/1, v/v) angezogen. Die Zugabe von Lizetan® (Bayer CropScience, Langenfeld, DE) diente der Bekämpfung von Schädlingen, wobei der Wirkstoff entsprechend der Empfehlung des Herstellers eingesetzt wurde. Nach einer dreitägiger Stratifizierung (4 °C, kein Licht) keimten die Pflanzen ca. drei Wochen unter Kurztagbedingungen (10 h Licht) bei durchschnittlich 23 °C und einer Lichtintensität von 100 - 130 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aus.

Für Kurzzeitexperimente zur Untersuchung der Folgen von Geninaktivierung bis 24 h nach Behandlung mit Dexamethason (DM) wurden die Keimlinge für drei Tage in Dauerlicht akklimatisiert. Danach wurden diese mit 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DM (Stammlösung 10 mg ml^{-1} Ethanol), 0,001 % (v/v) Silwet-L77 (Lehle Seeds, Roundrock, USA) in 0,2 % (v/v) Ethanol bzw. Kontrolllösung (0,001 % (v/v) Silwet-L77 in 0,2 % (v/v) Ethanol) besprüht.

Für Langzeitexperimente, bei denen die Folgen der Geninaktivierung über mehrere Tage untersucht wurden, kamen zwei Wochen alte, auf MS-Nährmedium angezogene Keimlinge zum Einsatz. Das MS-Medium setzte sich aus 4,43 g l^{-1} Murashige und Skoog Medium mit Vitaminen (Duchefa, Haarlem, NL) sowie 8 g l^{-1} Difco™ Agar (BD, Heidelberg, DE) zusammen. Vor dem Aufkochen des MS-Nährmediums wurde der pH-Wert mit 0,1 M KOH auf pH 5,7 eingestellt. Die MS-Platten wurden unter sterilen Bedingungen gegossen und anschließend die sterilisierten Samen aufgebracht.

Das Saatgut wurde unter fünfminütigem Schwenken in einer Lösung aus 70 % Ethanol und 0,05 % Triton X-100 sterilisiert. Der Überstand wurde verworfen, das Saatgut zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit 95 % Ethanol gewaschen und anschließend für ca. zwei Stunden unter der Sterilbank getrocknet.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte entsprechend der Stratifizierung unter Dauerlicht bei durchschnittlich 23 °C und einer Lichtintensität von 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Nach

14 Tagen wurden die Keimlinge für die anschließenden Experimente auf MS-Platten mit 20 µg ml⁻¹ DM bzw. Kontrolllösung (s.o.) umgesetzt.

Für alle Analysen wurden je Probe 30-50 mg Frischmasse (FM) aus mehreren Keimlingen geerntet und direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Das tiefgefrorene Pflanzenmaterial wurde in der Schwingmühle zu einem feinen Pulver homogenisiert. Für Analysen mittels HPLC wurden die Proben vor der Extraktion zusätzlich gefriergetrocknet, um enzymatische Umwandlungen der zu untersuchenden Metabolite zu minimieren.

2.3.2 Bakterien und deren Kultivierung

Für die Anzucht von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* wurde autoklaviertes LB- bzw. YEB-Nährmedium sowie steril filtrierte SOC-Medium verwendet.

Das LB-Nährmedium setzte sich aus 10 g l⁻¹ Bacto-Trypton, 5 g l⁻¹ Hefeextrakt und 10 g l⁻¹ NaCl zusammen. Der pH-Wert von 7,5 wurde mit 1 M HCl eingestellt und für die Herstellung von Festmedium wurden 15 g l⁻¹ Agar (AppliChem) hinzugefügt. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C auf LB-Platten im Anzuchtschrank oder als Flüssigkultur bei 37°C, 225 rpm im Schüttelinkubator.

Das YEB-Medium beinhaltete 5 g l⁻¹ Trypton, 1 g l⁻¹ Hefeextrakt, 5 g l⁻¹ Saccharose und 0,49 g l⁻¹ MgSO₄ × 7 H₂O. Mit 1 M HCl wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die Herstellung von Festmedium erfolgte wie oben beschrieben. Unter Zugabe von 100 µg ml⁻¹ Rifampicin (Duchefa, Stammlösung 25 mg ml⁻¹ in DMSO) erfolgte die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* bei 30 °C auf Platten oder in Flüssigkultur bei 30 °C und 225 rpm.

Der Einsatz von zusätzlichen Antibiotika bei der Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens* wird in den folgenden Kapiteln im Einzelnen beschrieben.

Das SOC-Medium enthielt 20 g l⁻¹ Trypton, 5 g l⁻¹ Hefeextrakt, 0,5 g l⁻¹ NaCl, 0,185 g l⁻¹ KCl, sowie 3,92 g l⁻¹ Glukose und hatte einen pH-Wert von 7, der mit 1 M HCl eingestellt wurde.

2.3.3 Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit induzierbarer Reprimierung der Expression von Genen der Tetrapyrrolbiosynthese

Für die Erzeugung transgener *Arabidopsis* Pflanzen mit DM-induzierbarer Expression von RNAi-Konstrukten wurde das Plasmid pOpOff2_{Hyg} (Wielopolska *et al.*, 2005) verwendet,

welches von C. Helliwell (CSIRO Plant Industry, Australien) zur Verfügung gestellt wurde. Die T-DNA des pOpOff2 Plasmids kodiert den chimären Transkriptionsfaktor LhGR (Craft *et al.*, 2005), welcher unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors konstitutiv exprimiert wird. In Anwesenheit von Dexamethason (DM) aktiviert der LhGR Transkriptionsfaktor ausgehend vom pOp6-Promotor die Expression des RNAi-Konstruktes.

Für die Klonierung von *CHLH*, *CHLD*, *CHLM* und *CHL27* RNAi-Konstrukten wurde die Gateway®-Technologie (Life Technologies) angewendet. Hierbei werden *att*-Sequenzen des Bakteriophagen genutzt, um durch homologe Rekombination spezifische DNA-Fragmente in den Zielvektor zu integrieren. Zur Amplifikation der jeweiligen Zielsequenz wurde *Arabidopsis* Wildtyp cDNA eingesetzt. Die verwendeten Primer (Nr. 75 - 82 Tabelle 12) wurden mit den entsprechenden *att*-Rekombinationssequenzen versehen, so dass die spezifischen Gensequenzen zusätzlich die Gateway-Sequenzen *attL1* und *attL2* enthielten. Die Klonierung wurde dem Protokoll des Herstellers folgend unter Verwendung des Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix und des Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Life Technologies) durchgeführt. Mit Überführung der Sequenzen von AT5G13630 (280 bp, At*CHLH*), AT1G08520 (158 bp, At*CHLD*), AT4G25080 (388 bp, At*CHLM*) und AT3G56940 (304 bp, At*CHL27*) (Tabelle 11) in den *Entry*-Vektor pDONR™221 (Life Technologies) und der anschließenden Transformation von *E. coli* DH5α (Kap. 2.4.2) wurden *Entry*-Klone erzeugt, die auf LB-Medium mit 50 µg ml⁻¹ Kanamycin selektiert wurden. Es folgten Kolonie-PCR (Kap. 2.5.5), DNA-Sequenzierung (Kap. 2.5.4), Auswahl geeigneter Klone und Plasmidisolation (Kap. 2.5.1) bevor die DNA-Fragmente in das Zielplasmid pOpOff2 kloniert wurden. Die Selektion der Klone erfolgte auf LB-Medium mit 50 µg ml⁻¹ Spectinomycin gefolgt von der beschriebenen Vorgehensweise nach der Selektion der *Entry*-Klone.

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden die pOpOff2 Plasmide (Kap. 2.4.4) eingesetzt, bevor mittels der *floral dip* Methode *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen stabil transformiert wurden (Kap. 2.4.5). Das in der T-DNA enthaltene *hyg*-Gen kodiert für eine Hygromycin-B-Phosphotransferase und vermittelt die Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin. Das gewonnene Saatgut wurde sterilisiert (Kap. 2.3.1) und die Primärtransformanten wurden auf MS-Medium mit 35 µg ml⁻¹ Hygromycin B selektiert, auf Erde umgesetzt und unter Langtagbedingungen zur Blüte gebracht.

2.4 Transformationstechniken

2.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für diese Arbeit wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe, DE) verwendet. Der Genotyp dieses Stammes ist F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1*. Als Vorkultur wurden 20 ml LB-Medium mit *E. coli* DH5 α angeimpft und ÜN bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurde eine 500 ml LB-Kultur mit 5 ml Vorkultur angeimpft, bei 37 °C und 225 rpm inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 geerntet. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 6.000 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml einer sterilen, eiskalten 100 mM MgCl₂ Lösung resuspendiert und die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 5.000 g pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 2 ml einer sterilen, eiskalten 100 mM MgCl₂ Lösung mit 15 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Suspension wurde aliquotiert, schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* DH5 α Zellen erfolgte nach der Methode von Sambrook und Russel (Sambrook & Russell, 2001). In Vorbereitung auf die Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, anschließend 1 μ l Plasmid hinzugegeben und der Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1,5 min sowie die Inkubation für 1 min auf Eis. Die Regeneration der Zellen erfolgte nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 225 rpm. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.4.3 Herstellung elektrisch kompetenter Agrobakterien

Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV2260 (Hellens *et al.*, 2000) wurde in 1 l YEB-Medium mit 25 μ g ml⁻¹ Rifampicin ÜN bei 30 °C und 225 rpm kultiviert. Bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 2,0 wurden die Zellen geerntet. Durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 4.000 g wurden die Zellen pelletiert und in 1 Vol 4°C eiskalten Wassers resuspendiert. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, bevor das Zellpellet in 2 ml 4 °C kaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert wurde. Aliquots von 40 μ l wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.4 Transformation von Agrobakterien

Die Transformation von Agrobakterien erfolgte mittels Elektrotransformation mit einem MicroPulser™ Electroporator. Ein Aliquot elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 10 - 50 ng Plasmid DNA versetzt und in einer Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 mm für 2 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2200 V mit einer Zeitkonstante von 5 msec. Die Zellen wurden anschließend sofort in 500 µl SOC-Medium resuspendiert und für 1 h bei 30 °C und 225 rpm inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

2.4.5 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *A. thaliana* basierte auf der *floral dip* Methode (Clough & Bent, 1998). Es wurden *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, unter Kurztagbedingungen angezogen und unter Langtagbedingungen zur Blüte gebracht.

Die zu verwendeten Agrobakterien wurden zunächst, wie in Kapitel 2.4.4 beschrieben, mit den Plasmiden pOpOff2_AtCHLH, pOpOff2_AtCHLD, pOpOff2_AtCHLM und pOpOff2_AtCHL27 transformiert und auf YEB-Medium mit 50 µg ml⁻¹ Spectinomycin und 50 µg ml⁻¹ Rifampicin kultiviert. Die verwendeten Klone wurden mittels Kolonie-PCR (Kap. 2.5.5) auf das Vorhandensein des transformierten Plasmids überprüft. Von jeweils einem positiv getesteten Agrobakterien-Klon wurde eine 3 ml-Vorkultur in YEB-Medium mit 50 µg ml⁻¹ Spectinomycin und 50 µg ml⁻¹ Rifampicin angelegt und ÜN bei 28 °C und 225 rpm inkubiert. 500 µl dieser Vorkultur wurden zum Animpfen einer 200 ml-Kultur eingesetzt und ÜN bei 28 °C und 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch 20 min Zentrifugation bei 12 °C und 4.000 g pelletiert, zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und unverzüglich in Inokulationsmedium (0,5x MS, 0,05 % (w/v) MES, 5 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (v/v) Silwet L77, pH 5,7) aufgenommen. Die Agrobakterien-Suspension mit einer OD₆₀₀ von ca. 2,0 wurde mittels Pipette auf die geschlossenen *Arabidopsis* Blüten gebracht und die Pflanzen anschließend für zwei Tage in Schwachlicht inkubiert. Dieser Vorgang wurde für neu gebildete Blüten zweimal wiederholt und die Pflanzen bis zur Samenreife kultiviert. Die Blütenstände wurden in Papiertüten verpackt, um die Samen der Einzelpflanzen aufzufangen. Die Selektion erfolgte wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

2.5 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.5.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Nach 3 min Zentrifugation von 2 ml Bakterienkultur bei RT und 13.000 rpm wurde das Zellpellet in 250 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg ml⁻¹ RNase A) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Lysispuffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben, mehrmals invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Neutralisationspuffer (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugefügt, gut vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurden Proteine präzipitiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde mit 600 µl Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und für 10 min bei 4 °C und 13.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50 µl ddH₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Isolation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von genomischer DNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte aus ca. 50 mg Blattmaterial, welches in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Schwingmühle homogenisiert wurde. Nach Zugabe von 400 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS) wurde die Suspension gründlich gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 400 µl Isopropanol gefällt. Durch 10 min Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C) wurde die DNA pelletiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet, in 50 µl ddH₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA entsprechend ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch in 0,8 bis 1,2 % (w/v) Agarosegelen mit 0,002 % (w/v) Ethidiumbromid (EtBr) (Sambrook & Russell, 2001). Zu Herstellung der Gele wurde die Agarose (AppliChem) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht, EtBr hinzugeben und in den entsprechenden Apparaturen gegossen. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden

zunächst mit 0,17 Vol *6x DNA Loading Dye* (Thermo Scientific) versetzt und in die Probenaschen des erkalteten Agarosegels beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 80 bis 120 V und unter UV-Licht dokumentiert. Die Abschätzung der Größe der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit den DNA-Größenstandards *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* oder *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (beides Thermo Scientific).

2.5.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma SMB (Services in Molecular Biology GmbH, Berlin). Für die Sequenzierungsreaktion mit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies) wurden 350 ng Plasmid-DNA oder 50 ng PCR-Produkt sowie 0,5 µM Primer gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.5.5 PCR und Kolonie-PCR

Die Amplifikation von PCR-Fragmenten mittels PCR erfolgte unter Einsatz der *DreamTaq Green DNA Polymerase* (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Bestätigung der Transformation von *E. coli*, wurden mittels sterilisierter Zahnstocher Zellen einer einzelnen Kolonie in den PCR-Reaktionsansatz überführt und mit plasmidspezifischen Primern untersucht.

2.6 RNA-Techniken

2.6.1 Isolation von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden ca. 50 mg gefrorenes Pflanzenmaterial in der Schwingmühle zu einem feinen Pflanzenpulver homogenisiert, in 0,5 ml *TRIzol™* (Bioline) resuspendiert und für jeweils 5 min bei RT und auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Chloroform hinzugegeben, gründlich gemischt, für 5 min auf Eis inkubiert und bei 13.200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 500 µl Isopropanol hinzugegeben und die RNA für 20 min bei RT gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13.200 rpm, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70 %-igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 40 µl ddH₂O resuspendiert. Nach der

Bestimmung der RNA-Konzentration mittels Nanodrop wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden die RNA-Konzentration der Proben auf 0,25 µg µl⁻¹ ddH₂O angeglichen, jeweils 1 µg RNA auf ein 1,2 % iges Agarosegel aufgetragen und die RNA elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.5.3). In Vorbereitung darauf wurden alle verwendeten Glasgefäße sterilisiert (4h, 180°C) sowie Gelapparaturen mit verdünnter H₂O₂-Lösung gewaschen, um RNase Kontamination zu minimieren. Ließen sich die verschiedenen Untereinheiten der ribosomalen RNA als distinkte Banden im Agarosegel wieder finden, wurde die RNA für die cDNA-Synthese verwendet.

2.6.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden in einem Thermocycler (Biometra) in entsprechenden Reaktionsgefäßen durchgeführt. In einem Reaktionsansatz von 10 µl wurden 2 µg RNA gemäß den Herstellerangaben mit *DNase I* (Thermo Scientific) behandelt. Die Inaktivierung der *DNase I* erfolgte für 10 min bei 65 °C nach Zugabe von 1 µl EDTA. Mit diesem Reaktionsansatz wurde die reverse Transkription mittels *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific) in einem Endvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde der Oligo-dT₁₈-Primer verwendet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 200 µl mit ddH₂O aufgefüllt, bei -20 °C gelagert und für sqRT- und qRT-PCR-Analysen eingesetzt. Zur Überprüfung der vollständigen enzymatischen Verdauung der DNA wurde eine PCR-Analyse mit *Actin2*-Primern durchgeführt. War nach 40 Zyklen kein genomisches *Actin2*-Amplikon im Gel erkennbar, wurde die Probe für weitere qRT-PCR-Analysen herangezogen.

2.6.4 qRT-PCR-Analysen

Für die Bestimmung der Transkriptgehalte verschiedener *Arabidopsis* Gene wurden quantitative *real time* PCR-Analysen (qRT-PCR) unter Verwendung des *SensiMix™ SYBR® No-ROX Kits* (Bioline) durchgeführt.

Die qRT-PCR-Analysen wurden mit einem Reaktionsvolumen von 7 µl durchgeführt. Die Bedingungen waren bei allen Analysen gleich gewählt: Nach einer initialen Denaturierung von 10 min bei 95 °C folgten 45 Zyklen nach dem Schema 95 °C, 60 °C und 72 °C für jeweils 15 Sekunden. Abschließend wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, um die

spezifische Amplifikation zu überprüfen. Die Primer (Tabelle 12) lagen in einer Endkonzentration von 0,25 μM vor. Die Ergebnisse wurden als relative Expression zur Kontrollbedingung ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) oder zum Referenzgen ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) dargestellt (Livak & Schmittgen, 2001).

2.6.5 Transkriptom-Analysen

Die Transkriptomanalysen wurden mittels *Arabidopsis Microarray Gene Chip* ATH1 vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) durchgeführt. Dafür wurden entsprechende RNA-Proben an das NASC geschickt. Dort wurde die Qualität der RNA überprüft bevor diese für die weitere Verwendung freigegeben wurde. Zur Darstellung der differentiellen Expression von Genen wurde der *Arabidopsis*-Wildtyp mit der jeweiligen RNAi-Linie verglichen. Die Berechnung der differentiellen Expression erfolgte mittels der Software R unter Nutzung des LIMMA (Smyth, 2004) und Bioconductor Packets (Gentleman *et al.*, 2004). Die Übersetzung der Affymetrix *spots* wurde entsprechend der TAIR10 Annotation durchgeführt. Dazu wurde die *cdf* Datei genutzt, welche unter http://nmg-r.bioinformatics.nl/NuGO_R.html zur Verfügung steht. Desweiteren wurde die Funktion *just.rma* (RMA, *robust multi-array average expression measure*) mit den Standardeinstellungen eingesetzt (Irizarry *et al.*, 2003). Die ermittelten *p-values* wurden nach der Methode von Benjamini und Hochberg korrigiert (Benjamini & Hochberg, 1995). Gene galten dann als signifikant dereguliert, wenn der *p-value* $\leq 0,05$ und der *fold change* mindestens zweifach verändert waren. Alle differentiell exprimierten Gene wurden in einer *heatmap* mittels dem R Statistik Packet und der Funktion *heatmap.2* dargestellt.

2.7 Proteintechniken

2.7.1 Proteinisolierung aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus *Arabidopsis*-Keimlingen wurden zwischen 80 und 100 mg Blattmaterial, in flüssigem Stickstoff eingefroren, in der Schwingmühle homogenisiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Pflanzenpulver wurde in 5 Vol (v/w) Extraktionspuffer (56 mM Na_2CO_3 , 56 mM DTT, 2 % (w/v) SDS, 2 mM EDTA, 12 % (w/v), Saccharose, pH 8,0) resuspendiert, für 10 min bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und bei 13.000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Der Proteinextrakt wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.7.2 Proteinbestimmung mit Bradford oder BCA

Vorbereitend für die Proteinbestimmung wurden 20 µl Probe mit 500 µl kalter 10 % (w/v) Trichloressigsäure für 20 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert und in 100 µl 0,1 N NaOH resuspendiert. Auf diese Weise wurden u.a. das SDS und das DTT entfernt, die eine exakte Proteinbestimmung mit den folgenden Methoden behindern.

Die Proteinbestimmung nach Bradford erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm 5 min nach Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz (0,01 % (w/v) Coomassie Brilliantblau G-250, 5 % (v/v) EtOH, 8,5 % (v/v) H₃PO₄) zu 2 - 20 µl Probe.

Die Proteinbestimmung mittels *BCATM Protein Assay Kits* (Pierce, Rockford, USA) erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers mit 5 µl und 10 µl Probe photometrisch bei 562 nm.

Für die Kalibrierung wurde für beide Methoden eine Verdünnungsreihe von BSA vermessen. Als Referenz diente eine Probe mit 0,1 N NaOH.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Acrylamid-Matrix ermöglicht die Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrer Größe. Die Proteine werden durch SDS mit einer einheitlichen Ladung belegt und elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Bei diesem diskontinuierlichen Verfahren wird das Trenngel (8 %-15 % (v/v) Acrylamid 4K/Bisacrylamid 4K (29:1), 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS) mit Sammelgel (5 % (v/v) Acrylamid 4K/Bisacrylamid 4K (29:1), 130 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS) überschichtet. Die Polymerisation wurde jeweils durch Zugabe von 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 0,1 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei einer Spannung von 80 V, gefolgt von der Auftrennung im Trenngel bei 120 V. Als Laufpuffer wurde Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) *Coomassie[®] Brilliant Blue R250* (Serva), 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt.

2.7.4 Western Blot-Analysen

Die Proteine wurden aus den SDS-Polyacrylamidgelen mittels der *semi-dry* Methode auf Nitrozellulosemembrane (HybondTM-C, GE Healthcare) mit der Apparatur Trans-Blot[®] SD Cell (Bio-Rad) transferiert. Dazu wurde für 1 h eine konstante Stromstärke von 40 mA pro Gel eingestellt und eine Lösung aus 20 % (v/v) Methanol, 25 mM Tris, 250 mM Glycin und 0,01 % (w/v) SDS als Transferpuffer verwendet. Der Proteintransfer auf die Membran wurde mittels Ponceau-Färbung überprüft. Dazu wurde die Membran für 1 min in Ponceau-Lösung (5 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Ponceau S (Sigma-Aldrich)) inkubiert, mit Wasser gespült und dokumentiert. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in TBST-Puffer (12,4 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20) mit 5 % (w/v) Milchpulver auf einem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST und viermal für 10 min mit TBS gewaschen. Es folgte der immunologische Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper (Tabelle 3). Nach einer Inkubationszeit von 1-2 h mit dem in TBS (1 % (w/v) Milchpulver) verdünnten Antikörper wurden die Membraneerneut wie beschrieben gewaschen. Anschließend verblieb der sekundäre Peroxidase-konjugierte Antikörper verdünnt in TBS mit 2 % (w/v) Milchpulver für 2 h auf der Membran. Nach erneuten Waschen zweimal für 10 min in TBST und sechsmal für 5 min in TBS folgte der Nachweis der Chemilumineszenz nach den Angaben des Herstellers des *ECLTM Western Blot Detection Reagent* (GE Healthcare) und unter Einsatz der CCD-Kamera.

Tabelle 3: Übersicht über Antikörper, die für die Hybridisierung von Western Blot Membranen verwendet wurden.

Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Antikörper in Kaninchen hergestellt und kamen als Kaninchen IgG Seren zum Einsatz.

| Name | Antigen / Organismus / Verdünnung | Hersteller / Referenz |
|-----------------------------|---|---|
| Anti-GluTR | AtGluTR / <i>A. thaliana</i> | 1:200 (Hedtke <i>et al.</i> , 2007) |
| Anti-GSAAT | HvGSAAT / <i>H. vulgare</i> | 1:5.000 (Grimm <i>et al.</i> , 1989) |
| Anti-CHLM | NtCHLM / <i>N. tabacum</i> | 1:1.500 (Alawady & Grimm, 2005) |
| Anti-CRD1/CHL27 | AtCHL27 / <i>A. thaliana</i> | 1:2.000 Agrisera AB, SE |
| Anti-GUN4 | AtGUN4 / <i>A. thaliana</i> | 1:2.000 (Peter & Grimm, 2009) |
| Anti-LHCA1 | AtLHCA1 / <i>A. thaliana</i> | 1:5.000 Agrisera AB, SE |
| Anti-LHCB1 | AtLHCB / <i>A. thaliana</i> | 1:2.500 Agrisera AB, SE |
| Anti-Kaninchen- IgG- HRP | Ziegen IgG gerichtet gegen Kaninchen IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase | 1:10.000 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE |

2.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.8.1 Herstellung von Chloroplastensuspensionen aus *Arabidopsis thaliana*

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der MgPME-Zyklase erfolgte in Chloroplastenrohextrakten von Wildtyp-Pflanzen und den entsprechenden RNAi-Linien, die wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben auf Erde angezogen wurden. Die ca. 3 Wochen alten Keimlinge wurden 24 h vor der Blatternte mit Dexamethason (Kapitel 2.3.1) besprüht.

In Vorbereitung auf die Extraktion wurden Mörser, Pistill und Trichter gründlich mit ddH₂O gereinigt und in einem Eisbad vorgekühlt. Für eine Extraktion wurden die in einem Topf von 5 cm Durchmesser und 6 cm Höhe gewachsenen Keimlinge mit der Schere abgeschnitten und direkt in den vorgekühlten Mörser gegeben. Nach Zugabe von 40 ml vorgekühltem Puffer 1 (0,4 M Sorbitol, 20 mM Tricin, 10 mM NaHCO₃ und 0,1 % (w/v) BSA, pH 8,0) wurden die Keimlinge mit dem Pistill mechanisch aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch eine Lage Miracloth Filterpapier (Merck) filtriert. Anschließend wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation bei 500 g und 4 °C für 8 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit dem Puffer 1 ohne BSA gewaschen und schließlich in 1,5 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und je zwei Aliquots von 5 µl und 10 µl zur Bestimmung des Proteingehaltes (Kap. 2.7.2) verwendet. Die Chloroplastensuspension wurde bis zur Verwendung lichtgeschützt auf Eis gelagert.

2.8.2 Assay zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

Der Reaktionspuffer für den Assay zur Bestimmung aller drei Enzymaktivitäten bestand aus 0,8 M Sorbitol, 40 mM Tricin, 20 mM NaHCO₃, 25 mM MgCl₂, 1 mM DTT sowie 0,2 % (w/v) BSA und wurde auf pH 8,0 eingestellt. Zusätzlich wurden für die einzelnen Assays die notwendigen Substrate und Co-Faktoren hinzugegeben. Zum Starten des Assays wurden gleiche Volumina des Reaktionspuffers und des Chloroplastenextrakts gemischt. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt in 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 30 °C und unter konstantem Schütteln bei 450 rpm. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von eisgekühltem Aceton:0,1 N NH₄OH (9:1, v/v) im Verhältnis 1:5 gestoppt. Bis zur Quantifizierung der jeweiligen Porphyrine mittels HPLC (Kap. 2.9) wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Die Analysen wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Es wurden für jeden Zeitpunkt der Probenentnahme jeweils drei Replikate analysiert. Der *steady state*-Gehalt des jeweiligen Produktes in dem Reaktionsgemisch zum Zeitpunkt t_0 wurde den restlichen Werte der Kinetik subtrahiert. Des Weiteren wurden Endpunktbestimmungen einer Kontrolle ohne Substrat und einer Kontrolle mit hitzeinaktivierter Chloroplastensuspension (5 min bei 95 °C) durchgeführt. Diese Kontrollen waren wichtig, um autokatalytische Prozesse zu erkennen.

2.8.2.1 Bestimmung der Aktivität der Mg-Chelatase

Die Durchführung des Assays zur Bestimmung der Aktivität der Mg-Chelatase erfolgte wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben. Dem Reaktionspuffer wurden dabei 16 mM ATP (Stammlösung 800 mM ATP in Wasser) und 20 μ M Proto IX (Stammlösung 20 mM in DMSO) hinzugefügt. Es wurden die Gehalte an gebildetem MgP nach 15, 30 und 45 min mittels HPLC bestimmt (2.9.3).

2.8.2.2 Bestimmung der Aktivität der Methyltransferase

Der Assay zur Bestimmung der Methyltransferase-Enzymaktivität wurde wie in Kapitel 2.8.2 durchgeführt, wobei dem Reaktionspuffer dabei 1 mM SAM (Stammlösung 50 mM in Wasser) und 40 μ M MgP (Stammlösung 20 mM in DMSO) hinzugefügt wurden. Die Aktivität der Methyltransferase wurde nach einer Reaktionszeit von 2, 4 und 6 Minuten gestoppt und der Gehalt an MgPMME bestimmt mittels HPLC bestimmt (Kap. 2.9.3).

2.8.2.3 Bestimmung der Aktivität der MgPME-Zyklase

Für die Bestimmung der Aktivität der MgPME-Zyklase wurde dem Reaktionspuffer (Kapitel 2.8.2) 1 mM NADPH (Stammlösung 50 mM in Wasser) und 12 μ M MgPME (Stammlösung 0,6 mM in DMSO) zugegeben. Da Protochlorophyllid, das Produkt der MgPME-Zyklase, sehr schnell durch die lichtabhängige Protochlorophyllid Oxidoreduktase zum Chlorophyllid umgesetzt wird, wurde die MgPME-Zyklase Aktivität durch die Abnahme des Substrates MgPME bestimmt. Dazu wurde der Gehalt an MgPME nach einer Reaktionszeit von 15, 30, 45 und 60 min mittels HPLC bestimmt bestimmt (Kap. 2.9.3).

2.8.3 Bestimmung der ALA-Synthesekapazität

Für die Bestimmung der 5-Aminolävulinsäure-Synthesekapazität wurde ALA über einen definierten Zeitraum in den Pflanzengewebe angereichert und nach einer Kondensationsreaktion mit Ethylacetoacetat mittels einer Farbreaktion detektiert und

quantifiziert (Mauzerall & Granick, 1956). Um eine Akkumulation von ALA im Pflanzengewebe zu erzielen, wurde Lävulinsäure, ein kompetitiver Inhibitor der ALA-Dehydratase, eingesetzt. Diese hemmt die Umsetzung von ALA zum Porphobilinogen im Pflanzengewebe. Nach der Reaktion von ALA mit modifizierter Ehrlich's Reagenz wird die Menge an gebildeten Pyrrol spektrophotometrisch bestimmt und dient als Grundlage für die Berechnung der ALA-Synthesekapazität.

Dazu wurden die ca. 3 Wochen alten *Arabidopsis*-Keimlinge wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben herangezogen und mit Dexamethason bzw. Kontrollpuffer behandelt (Kapitel 2.3.1). Es wurde ca. 50 mg Blattmaterial von mehreren Keimlingen in 6 ml Inkubationspuffer (40 mM Lävulinsäure, 20 mM Tris/HCl, pH 7,2) für mindestens 4 h unter Anzuchtbedingungen inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Inkubationspuffer entfernt und die trockenen Keimlinge in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Proben wurden in der Schwingmühle zu einem feinen Pflanzenpulver homogenisiert, in 1 ml 20 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,8) resuspendiert und für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden mit 100 µl Ethylacetoacetat vermischt, für 10 min bei 95 °C gekocht und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 500 µl modifizierte Ehrlich's-Reagenz (75 % (v/v) Essigsäure, 12,5 % (v/v) Perchlorsäure, 3,1 g l⁻¹ Hg₂Cl₂, 18,2 g l⁻¹ *p*-Dimethylaminobenzaldehyd) hinzugegeben, gemischt und für 5 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Mittels einer Kalibriergerade wurde die Menge an gebildetem ALA direkt im Anschluss bei einer Wellenlänge von 553 nm photometrisch bestimmt.

2.9 HPLC-Analysen von Metaboliten der Chlorophyllbiosynthese

2.9.1 Herstellung von Pflanzenextrakten aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Herstellung von Pflanzenextrakten für HPLC-Analysen wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, die mögliche autokatalytische Veränderungen oder den Abbau der Analyten während der Extraktion und der Lagerung minimiert. Dazu wurden die *Arabidopsis*-Keimlinge, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, angezogen und behandelt. Es wurden 30 - 50 mg Pflanzenmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Schwingmühle zu einem feinen Pflanzenpulver homogenisiert. Hierbei war darauf zu achten, dass alle Proben in gleicher Qualität homogenisiert wurden, um eine einheitliche Extraktion der Analyten zu gewährleisten. Zur Verringerung des Wassereintrags während

der Extraktion wurden die Proben gefriergetrocknet. Der hohe Anteil an organischen Lösungsmitteln während der Extraktion reduziert mögliche Enzymaktivitäten im Extrakt, wodurch systematische Fehler verhindert werden konnten. Weiterhin konnte nach der Gefrier Trocknung sehr exakt die Trockenmasse der Proben mittels Feinwaage bestimmt werden, was bei der Bestimmung der Bezugsgröße Frischmasse gerade bei größeren experimentellen Ansätzen und einem engen Zeitrahmen oft zu systematischen Fehlern führt.

Die Extraktion erfolgte durch die Zugabe von 600 µl eisgekühltem Aceton:0,1 M NH₄OH (9:1, v/v) zu den gefriergetrockneten Pflanzenproben und einer Inkubationszeit von mindestens 30 min bei -20 °C. Während der Inkubation wurden die Proben zwei bis dreimal gemischt, um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert und vor der HPLC-Analyse für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Die Bestimmung der Porphyrin- und Pigment-Gehalte erfolgte mittels HPLC-Systemen der Serie 1100 und 1290 (Agilent Technologies). Die Proben wurden während der Analyse abgedunkelt und bei 8 °C im Autosampler gelagert. Zur Detektion der verschiedenen Analyten wurden Diodenarray- oder Fluoreszenzdetektoren eingesetzt. Die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten erfolgte über Standards (Frontier Scientific) der entsprechenden Substanzen.

2.9.2 Bestimmung der Chlorophyllgehalte

Die Chlorophylle *a* und *b* wurden auf einer ProntoSil 200-3-C30-Säule (250 x 4,6 mm, 3,0 µm, Bischoff Chromatography) bei 21 °C und einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ voneinander getrennt und bei einer Absorptionswellenlänge von 440 nm mittels Diodenarray-Detektor detektiert (HPLC 1100). Die Elution erfolgte über ein Gradientensystem aus Lösung A (90 % (v/v) Acetonitril, 10 % (v/v) Wasser, 0,1 % (v/v) Triethylamin) und Lösung B (100 % Ethylacetat). Zwischen 0 und 3 min wurde der Anteil von Lösung B linear von 0 % auf 30 % erhöht, gefolgt von einem linearen Gradienten zwischen 3 und 20 min auf 100 % Lösung B. Es schlossen sich ein isokratischer Schritt von 4 min bei 100 % Lösung B und ein Schritt der Reäquilibration der Säule von 4 min bei 100 % Lösung A an.

Diese Methode ist ebenfalls geeignet, um die Gehalte von Carotinoiden zu bestimmen.

2.9.3 Bestimmung der Porphyringehalte

Die Gehalte an Proto IX, MgP und MgPME wurden mittels Fluoreszenzdetektion bestimmt (HPLC 1100). Die Trennung erfolgte unter Verwendung einer Poroshell 120 EC-C18-Säule (150 x 3,0 mm, 2,7 μm , Agilent Technologies) bei 21 °C. Die Flussrate für die Bestimmung des Proto IX-Gehaltes betrug 0,5 ml min⁻¹ und 0,55 ml min⁻¹ für die Bestimmung der MgP und MgPME-Gehalte. Bei beiden Methoden erfolgte die Elution isokratisch mit 90 % (v/v) Lösung A (90 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) 1 M Ammoniumacetat, pH 7,0) und 10 % (v/v) Lösung B (100 % Ethylacetat). Die Anregungswellenlänge zur Messung von Proto IX betrug 405 nm sowie 420 nm für die Messung von MgP und MgPME. Die Emissionswellenlängen lagen bei 637 nm für Proto IX und 600 nm für die beiden Mg-Porphyrine. Die Datenrate des Fluoreszenzdetektors lag bei 2,31 Hz und für die Signalverstärkung mittels *photomultiplier* (PMT) wurde *gain* 17 gewählt.

2.9.4 Bestimmung der Gehalte an Protochlorophyllid und Chlorophyllid

Die Bestimmung der Gehalte an Pchlid und Chlid erfolgte mittels Fluoreszenz- bzw. Diodenarray-Detektor (HPLC 1290). Die Trennung erfolgte über eine Nova-Pak-C18-Säule (150 x 3,9 mm, 4 μm , Waters) bei 21 °C und einer Flussrate von 1 ml min⁻¹. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von Lösung A (90 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ammoniumacetat, pH 7,0) und Lösung B (80 % (v/v) Methanol, 20 % (v/v) Aceton) innerhalb der ersten 7,5 min von 0 % B auf 30 % B gefolgt von einem Waschschriff bei 100 % B und der Reäquilibration der Säule bei 100 % A von jeweils 5 min. Die Detektion von Pchlid erfolgte mittels FLD bei einer Anregungswellenlänge von 435 nm und einer Emissionswellenlänge von 644 nm (Datenrate 4,63 Hz, PMT *gain* 18). Der Gehalt an Chlid wurde mittels DAD und einer Absorptionswellenlänge von 430 nm bestimmt.

2.9.5 Bestimmung des Häm-Gehaltes

Für die Bestimmung des Gehaltes an nicht-kovalent gebundenem Häm war ein zusätzlicher Extraktionsschritt nötig. Im Anschluss an die in Kapitel 2.9.1 beschriebene basische Extraktion wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 200 μl Häm-Extraktionslösung (Aceton:DMSO:HCl_{konz}, 10:2:0,5, v/v/v) resuspendiert, 15 min bei RT inkubiert und 15 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Die Extrakte wurden sofort nach der Extraktion wie folgt analysiert:

Die Trennung erfolgte über eine Poroshell 120 EC-C18-Säule (100 x 3,0 mm, 2,7 μm , Agilent Technologies) bei 21 °C und einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹ isokratisch bei 30 % (v/v) Lösung A (100 % (v/v) bidest. Wasser, pH 3,2) und 70 % (v/v) Lösung B (100 % (v/v) Methanol). Nach 8 min schlossen sich ein Waschschrift von 4 min bei 100 % B und das Reäquilibrieren der Säule bei 100 % A für 3 min an. Die Detektion erfolgte mittels Diodenarray-Detektor bei einer Absorptionswellenlänge von 398 nm.

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit induzierbarer Reprimierung der Expression von Genen der Tetrapyrrolbiosynthese

Der gegenwärtige Wissensstand über die durch Tetrapyrrole (TP)-vermittelte retrograde Signaltransduktion beruht im Wesentlichen auf Untersuchungen konstitutiv beeinträchtigter Mutanten in Kombination mit physiologischen Manipulationen, wie z.B. durch das Herbizid Norflurazon. Zur Identifizierung TP-vermittelter Signale ist es notwendig, transgene *Arabidopsis thaliana* Linien mit induzierbarer Reprimierung der Expression von Schlüsselenzymen des Mg-Zweigs der TPBS zu verwenden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde der Vektor pOpOff2 eingesetzt. Das binäre Plasmid zur Dexamethason-induzierbaren Expression eines RNAi-Konstruktes exprimiert in den transgenen *Arabidopsis*-Mutanten konstitutiv den chimären Transkriptionsfaktor LhGR. Erst nach Zugabe des Glucocorticoids DM bindet LhGR an den pOp6-Promotor, wodurch die RNAi-Kassette exprimiert wird. Ziel ist es, dass sich die transgenen Pflanzen vor der Behandlung mit DM phänotypisch und makroskopisch nicht vom Wildtyp unterscheiden, wodurch sekundäre und pleiotrope Effekte bei der Untersuchung von TP-vermittelten Signalen minimiert werden können. Es wurden *Arabidopsis* RNAi-Linien generiert und untersucht, die nach Induktion des RNAi-Mechanismus mit DM spezifisch die Expression von Untereinheiten der Mg-Chelatase (CHLH und CHLD), der Methyltransferase (CHLM) und der MgPME-Zyklase (CHL27) inhibieren. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der verwendeten induzierbaren RNAi-Linien und die entsprechenden Transgene.

Tabelle 4: Übersicht über die pOpOff2-Konstrukte und die verwendeten induzierbaren *Arabidopsis* RNAi-Linien.

Gezeigt sind die RNAi-Konstrukte, der *Arabidopsis* Gene Identifier (AGI) des entsprechenden Gens sowie der Bereich der kodierenden Sequenz, der für die Klonierung ausgewählt wurde. Die Untereinheiten der Mg-Chelatase werden u.a. von den Genen *AtCHLH* und *AtCHLD* kodiert. Die Methyltransferase und eine Untereinheit der MgPME-Zyklase werden von *AtCHLM* bzw. *AtCHL27* kodiert. Die Selektion von Primärtransformanten erfolgte auf MS-Medium mit 35 µg ml⁻¹ Hygromycin. Gezeigt sind die Anzahl an Primärtransformanten, die auf Erde transferiert wurden und die in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Linien.

| RNAi-Konstrukt | AGI (Gen Modell) | Klonierter Bereich der kodierenden Sequenz für das RNAi-Konstrukt | Anzahl der erzeugten <i>Arabidopsis</i> Primärtransformanten | In dieser Arbeit verwendete RNAi-Linien (T3) |
|----------------|------------------|---|--|--|
| CHLH | AT5G13630.1 | 2787 bp - 3067 bp | 11 | #8l |
| CHLD | AT1G08520.1 | 2043 bp - 2201 bp | 9 | #10h |
| CHLM | AT4G25080.1 | 726 bp - 1114 bp | 19 | #5 |
| CHL27 | AT3G56940.1 | 320 bp - 624 bp | 2 | #21j |

Die Klonierung der RNAi-Konstrukte CHLD und CHLM, sowie deren Transformation in *Arabidopsis* wurden von Katja Boldt durchgeführt. Im Fall der CHLD Konstrukte konnte direkt mit Untersuchungen der selektierten CHLD-RNAi-Linie #10h begonnen werden. Zur Selektion des RNAi Konstruktes CHLM wurden Samen des transformierten Wildtyps auf MS-Medium mit 35 µg ml⁻¹ Hygromycin ausgesät. Die Klonierung und Transformation der CHLH und CHL27 Konstrukte, sowie erste Analysen der Primärtransformanten wurden von Annabel Girke durchgeführt. Sie hat mittels sqRT-PCR verminderte *AtCHLH* bzw. *AtCHL27* Transkriptgehalte in DM-behandelten Einzelblättern der Primärtransformanten nachgewiesen (Girke, 2015).

Um ausreichend Saatgut zu generieren wurden *Arabidopsis*-Pflanzen der verschiedenen RNAi-Linien auf Erde unter Kurztagbedingungen angezogen und nach sechs Wochen unter Langtagbedingungen zur Blüte gebracht (Kapitel 2.3.1). In dieser Arbeit wurde mit Pflanzen der T3-Generation der jeweiligen RNAi-Linie gearbeitet. Die Nachkommen der T2-Generation wurden hinsichtlich ihrer stabilen transgenen Eigenschaften untersucht. Dafür wurde der Phänotyp der T3-Generation von zehn Tage alten Keimlingen, die auf DM-haltigem MS-Medium wuchsen, überprüft. Durch eine mit der Keimung begonnenen Induktion der Geninaktivierung unterschieden sich die chlorotischen transgenen Keimlinge phänotypisch stark vom Wildtyp (Anhang, Abbildung 27). Es wurde jeweils eine repräsentative RNAi-Linie ausgewählt bei der alle Pflanzen einen chlorotischen Phänotyp nach Induktion aufwiesen. Demnach wurden die CHLH-RNAi-Linie #8l, die CHLD-RNAi-

Linie #10h, die CHLM-RNAi-Linie #5 sowie die CHL27-RNAi-Linie #21j für weitere Analysen eingesetzt.

3.1.1 Zeitlich aufgelöste Untersuchungen der mRNA-Gehalte von *AtCHLD* in der CHLD-RNAi-Linie #10h nach Induktion des RNAi-Mechanismus durch Dexamethason

Erste Untersuchungen der Induktionskinetik nach Applikation von DM wurden zunächst mit der CHLD-RNAi-Linie #10h durchgeführt. Die spezifische Geninaktivierung durch Expression des RNAi-Konstruktes wurde anhand des Transkriptgehaltes von *AtCHLD* in der CHLD-RNAi-Linie #10h zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit DM untersucht. Dazu wurden 14 Tage alte Keimlinge mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DM besprüht. Die mRNA-Gehalte von *AtCHLD* wurden zunächst vor der Induktion mit DM und zu drei Zeitpunkten nach der Induktion untersucht.

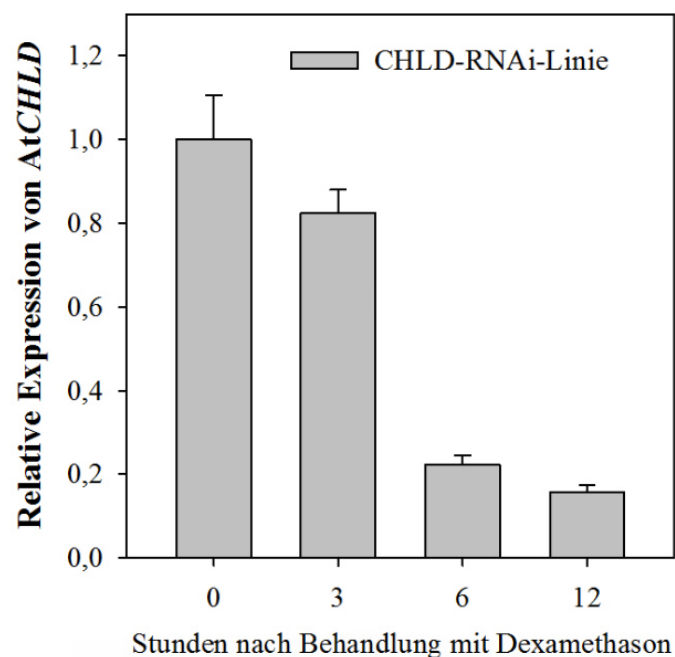


Abbildung 4: Quantitative RT-PCR Analysen zeigten eine schnelle Reduktion der *AtCHLD* Transkripte in der CHLD-RNAi-Linie #10h nach Dexamethasonbehandlung.

Die *AtCHLD* Expression wurde in 14 Tage alten, auf Erde gewachsenen Keimlingen (50 Stück) der CHLD-RNAi-Linie #10h bestimmt. Die Keimlinge wurden für drei Tage im Dauerlicht akklimatisiert und anschließend mit $400 \mu\text{l}$ DM ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) besprüht. Die *AtCHLD* Genexpression wurde vor (0 h) und nach der DM-Behandlung (3, 6 und 12 h) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten (+ S.D.) der relativen Expressionen als $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vor der Induktion (0) und dem Referenzgen *AtACT2*.

Die Behandlung von Keimlingen der CHLD-RNAi-Linie #10h mit DM führte innerhalb von drei Stunden zu einer Reduktion des *AtCHLD* Transkriptgehaltes um ca. 20 % im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 vor der Induktion. Nach sechs Stunden waren der *AtCHLD* Transkriptgehalt um ca. 80 % und nach zwölf Stunden um ca. 85 % reduziert (Abbildung 4). Für die Untersuchung der Dauer der RNAi-vermittelten spezifischen Geninaktivierung nach Behandlung mit DM wurde der Beobachtungszeitraum auf sechs Tage verlängert und die Kinetik der mRNA-Gehalte von *AtCHLD* in der CHLD-RNAi-Linie #10h im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp erstellt (Abbildung 5).

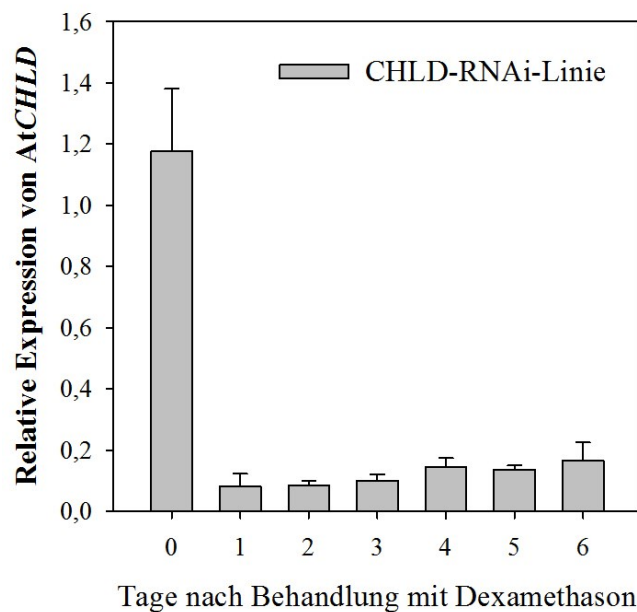


Abbildung 5: Quantitative RT-PCR Analysen zeigten eine stabile Reprimierung der mRNA-Gehalte von *AtCHLD* nach Behandlung der CHLD-RNAi-Linie #10h mit Dexamethason.

Die *AtCHLD* Expression wurde in 14 Tage alten, auf Erde gewachsenen Keimlingen (50 Stück) der CHLD-RNAi-Linie #10h und des Wildtyps bestimmt. Die Keimlinge wurden für drei Tage in Dauerlicht akklimatisiert und anschließend mit 400 µl DM (20 µg ml⁻¹) besprüht. Die *AtCHLD* Genexpression wurde vor (0 t) und nach der DM-Behandlung (1 bis 6 t, alle 24 h) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten (+ S.D.) der relativen *AtCHLD*-Expressionen ($2^{-\Delta\Delta CT}$) im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp und zur Expression des Referenzgens *AtACT2*.

Nach Induktion der CHLD-RNAi-Linie #10h war der mRNA-Gehalt von *AtCHLD* für sechs Tage um mindestens 80 % im Vergleich zum Transkriptgehalt des DM-behandelten Wildtyps reduziert. Nach 24 h wurde mit ca. 90 % die stärkste Reduktion der mRNA-Gehalte von *AtCHLD* beobachtet (Abbildung 5). Die Behandlung mit DM von fünf Wochen alten Wildtyp-Pflanzen führte zu keinen makroskopisch erkennbaren Veränderungen. Die Pflanze der CHLD-RNAi-Linie #10h zeigte als Konsequenz der reduzierten *AtCHLD*

mRNA-Gehalte und der daraus resultierenden Beeinträchtigung der Mg-Chelatase einen chlorotischen Phänotyp (Abbildung 6).



Abbildung 6: Chlorotischer Phänotyp bei einer repräsentativen *Arabidopsis*-Pflanze der CHLD-RNAi-Linie.

Die Abbildung zeigt jeweils eine ca. sechs Wochen alte unter Kurztagsbedingungen angezogene repräsentative *Arabidopsis* Pflanze des Wildtyps und der CHLD-RNAi-Linie #10h fünf Tage nach Behandlung mit jeweils 800 μl DM ($20\mu\text{g ml}^{-1}$).

Die Behandlung der Keimlinge der CHLD-RNAi-Linie #10h mit DM führte nach wenigen Stunden zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptgehalte von *AtCHLD*, die für mehrere Tage ohne eine erneute Zugabe von DM anhielt und zu Chlorosen führte. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden weiterführende Experimente mit allen vier RNAi-Linien (Tabelle 4) durchgeführt.

3.2 Untersuchung der Folgen einer Kurzzeitinduktion

3.2.1 Der Einfluss der reprimierten Genexpression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* oder *AtCHL27* auf Transkriptmengen anderer Gene des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese nach Kurzzeitinduktion

Die Analyse der mRNA-Gehalte von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* gab Aufschluss darüber, ob die schnelle Reduktion der jeweiligen Transkripte 24 h nach DM-Behandlung in allen RNAi-Linien nachweisbar war. Außerdem wurde der Einfluss der entsprechend reduzierten Transkriptgehalte auf die Expression anderer Gene des Mg-Zweigs der TPBS untersucht.

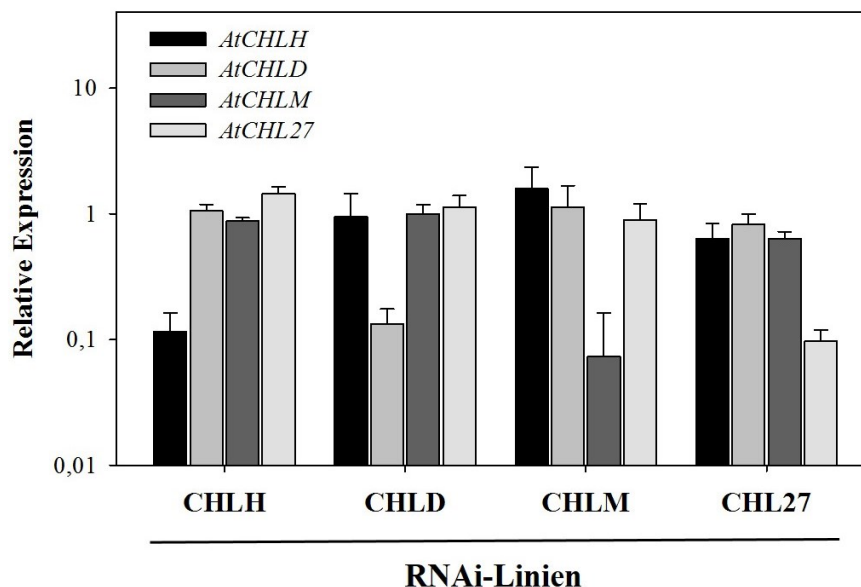


Abbildung 7: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte der *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* in den RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

Die *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* Transkriptgehalte wurden in 14 Tage alten, auf Erde gewachsenen Keimlingen (50 Stück) der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j bestimmt. Die Keimlinge wurden für drei Tage im Dauerlicht akklimatisiert und anschließend mit 400 µl DM (20 µg ml⁻¹) besprüht. Die Transkriptgehalte wurden nach 24 h DM-Behandlung bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte (+ S.D.) von vier biologischen Replikaten der relativen Expressionen ($2^{-\Delta\Delta CT}$) im Vergleich zu der jeweils uninduzierten RNAi-Linie und zur Expression des Referenzgens *AtACT2*.

Der Transkriptgehalt von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* war 24 h nach Induktion der Geninaktivierung in den entsprechenden RNAi-Linien um ca. 90 % im Vergleich zu den nicht mit DM behandelten Keimlingen reduziert (Abbildung 7). Die mRNA-Gehalte der jeweils anderen drei untersuchten Gene des Mg-Zweigs der TPBS zeigten nach 24 h Behandlung mit DM keine wesentlichen Veränderungen (Abbildung 7). Bereits 24 h nach Induktion der Expression des RNAi-Fragmentes wurde eine starke Reduktion der Transkripte der jeweiligen Zielgene in den RNAi-Linien erzielt (Abbildung 5 und Abbildung 8). Daher wurden alle weiteren Analysen mit diesen vier ausgewählten RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit DM durchgeführt, was im Folgenden als Kurzzeitinduktion bezeichnet wird. Basierend auf diesen Daten wurden umfangreiche Analysen im Rahmen der Kurzzeitinduktion durchgeführt, um unter anderem Auswirkungen auf Enzymaktivitäten und Gehalte von Metaboliten der TPBS zu untersuchen.

3.2.2 Reduzierte Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der MgPME-Zyklase nach Kurzzeitinduktion

Es wurde der Einfluss der reduzierten Transkriptgehalte der RNAi-Zielgene nach Kurzzeitinduktion in der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j auf die Enzymaktivitäten untersucht. Zur Bestimmung der Aktivität der Mg-Chelatase, Methyltransferase und der MgPME-Zyklase wurden Enzymassays 24 h nach Behandlung mit DM durchgeführt. Dazu wurden aus *Arabidopsis*-Keimlingen gewonnene Chloroplastensuspensionen (Kapitel 2.8.1) eingesetzt. Der Wildtyp und die RNAi-Linien wurden in je drei unabhängigen Anzuchten von jeweils ca. 50 drei Wochen alte Keimlingen unter Kurztagbedingungen angezogen und 24 h vor der Herstellung der Chloroplastenextrakte mit 200 μl DM (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$) besprüht.

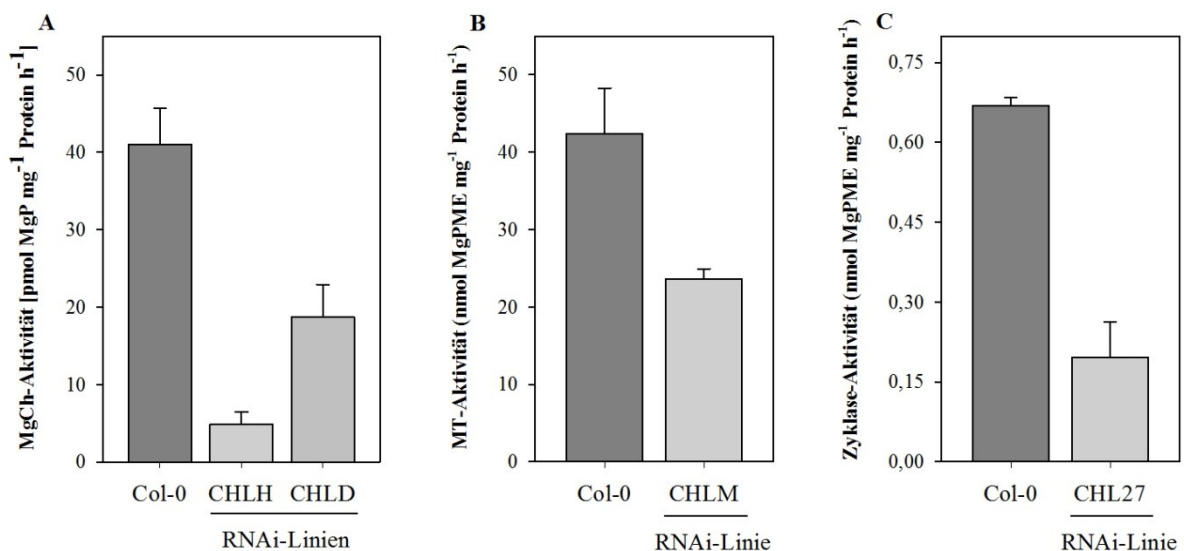


Abbildung 8: Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der MgPME-Zyklase der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

Die ca. drei Wochen alten Keimlinge der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j sowie des Wildtyps wurden mit 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DM besprüht und nach 24 h zur Herstellung der Chloroplastensuspension geerntet. Die Enzymaktivitäten der jeweiligen RNAi-Linien wurden mit der Aktivität des DM-behandelten Wildtyps verglichen. (A) Aktivität der Mg-Chelatase angegeben als Bildung von MgP, (B) der Methyltransferase angegeben als Bildung von MgPME und (C) der Zyklase angegeben als Verbrauch von MgPME relativ zum Gesamtproteingehalt und pro Zeiteinheit. Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) von drei biologischen Replikaten.

Die Ergebnisse der Enzymassays der Mg-Chelatase zeigten eine Reduktion der Aktivitäten in der CHLH- und CHLD-RNAi-Linie 24 h nach Induktion im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp. Die Verminderung der Mg-Chelatase-Aktivität war in der CHLH-RNAi-Linie #8l mit ca. 88 % wesentlich stärker als in der CHLD-RNAi-Linie #10h, welche

eine Reduktion der Mg-Chelatase-Aktivität um ca. 54 % im Vergleich zum Wildtyp zeigte (Abbildung 8 A). In den Keimlingen der CHLM-RNAi-Linie #5 hat die Methyltransferase nach Kurzzeitinduktion nur noch ca. 44 % der Aktivität im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp (Abbildung 8 B). Die Zyklase-Aktivität wurde auf der Basis der Abnahme des Substrates berechnet (Kapitel 2.8.2.3). Die CHL27-RNAi-Linie #21j zeigte 24 h nach DM-Behandlung eine um ca. 70 % reduzierte Zyklase-Aktivität gegenüber dem mit DM-behandelten Wildtyp (Abbildung 8 C).

Im Folgenden wurde die Auswirkung der reduzierten Enzymaktivitäten in den jeweiligen RNAi-Linien auf die Gehalte der Metaboliten des Mg-Zweigs der TPBS untersucht.

3.2.3 Veränderte Gehalte von Metaboliten des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese in den RNAi-Linien nach Kurzzeitinduktion

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob veränderte Gehalte von Metaboliten des Mg-Zweigs der TPBS signalgebend für eine Anpassung der Expression kernkodierter Gene sind. Dementsprechend wurde analysiert, ob die *steady state*-Gehalte an Proto IX, MgP, MgPME und Pchlid nach Kurzzeitinduktion verändert waren. Abbildung 9 zeigt die Gehalte aller Substrate und Produkte der Mg-Chelatase (A, B), der Methyltransferase (B, C) und der Zyklase (C, D).

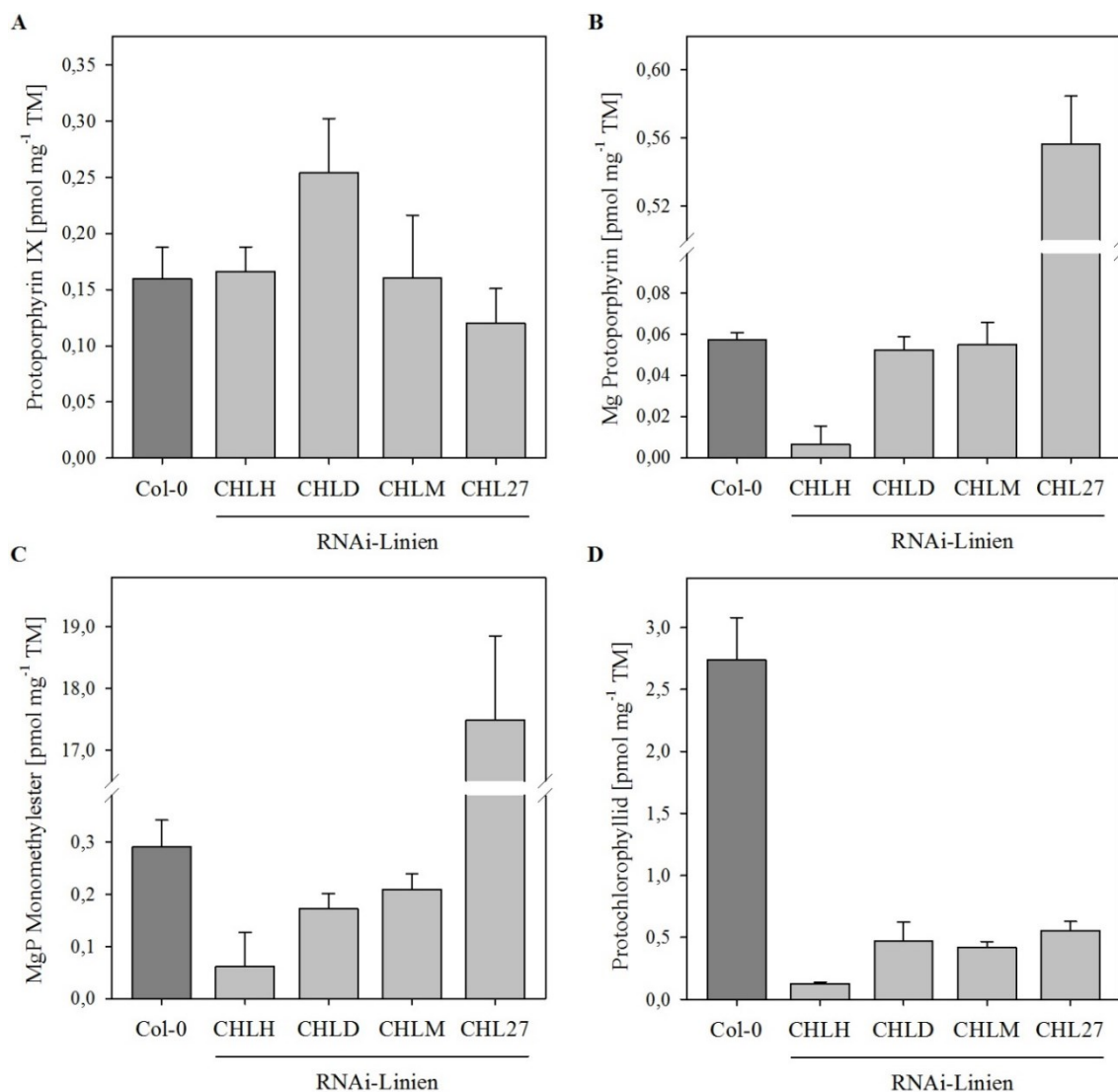


Abbildung 9: Gehalte von Intermediaten des Mg-Zweigs der Tetrapyrrolbiosynthese der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

Es wurden 14 Tage alte Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j mit DM (20 µg ml⁻¹) behandelt und nach 24 h geerntet. Aus dem gefriergetrockneten Pflanzenmaterial wurden acetonische Extrakte hergestellt und mittels HPLC analysiert. Abbildung (A) zeigt den Gehalt an Proto IX, (B) MgP, (C) MgPME und (D) Pchlid bezogen auf die Trockenmasse (TM). Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) von vier biologischen Replikaten.

In der CHLH-RNAi-Linie #81 waren 24 h nach Geninaktivierung die *steady state*-Gehalte von MgP, MgPME und Pchlid gegenüber dem mit DM-behandelten Wildtyp reduziert (Abbildung 9 B, C, D). Der Gehalt des Substrates der Mg-Chelatase, Proto IX, war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 9 A). In der CHLD-RNAi-Linie #10h war nach Induktion des RNAi-Mechanismus ebenfalls die Aktivität der Mg-Chelatase reduziert (Abbildung 8 A), wobei der Effekt auf der Ebene der Porphyringehalte weniger stark ausfiel. Der Gehalt an Proto IX war um 150 % erhöht, während das Produkt der

Mg-Chelatase, MgP, im Vergleich zum Wildtyp unverändert war. Die Gehalte der folgenden Intermediate, MgPME und Pchlid dagegen waren reduziert, wenn auch nicht so stark wie in der CHLH-RNAi-Linie #8l (Abbildung 9 C, D). In der CHLM-RNAi-Linie #5 war der Gehalt des Substrates der Methyltransferase, MgP, gegenüber dem des DM-behandelten Wildtyps unverändert. Ein Rückstau auf der Ebene von Proto IX war ebenfalls nicht zu verzeichnen (Abbildung 9 A, B). Die Folgeintermediate dieses Enzymschrittes MgPME und Pchlid waren aufgrund der verminderten Aktivität der Methyltransferase (Abbildung 8 B) reduziert (Abbildung 9 C, D). Die Auswirkungen der Reprimierung der Expression von *AtCHL27* in der CHL27-RNAi-Linie #21j zeigte sich am deutlichsten in den verminderten Porphyringehalten. Nicht nur das Substrat der Zykase, MgPME, sondern auch MgP akkumulierten im Vergleich zum Wildtyp in großen Mengen (Abbildung 9 B, C). Der Gehalt an MgPME war etwa um das 60fache und der Gehalt an MgP etwa um das 10fache gegenüber dem Wildtyp erhöht. Der Proto IX-Gehalt war nach Kurzzeitinduktion der CHL27-RNAi-Linie #21j im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp unverändert, wobei der Gehalt an Pchlid reduziert war (Abbildung 9 A, D).

Hinsichtlich der Gehalte der Mg-Porphyrine MgP und MgPME repräsentieren die CHLH- und CHL27-RNAi-Linie zwei unterschiedliche Zustände. Die CHLH-RNAi-Linie weist eine Reduktion und die CHL27-RNAi-Linie eine Akkumulation der Mg-Porphyrine auf. Die CHLD- und CHLM-RNAi-Linie entsprachen diesbezüglich eher einem wildtypähnlichen Zustand. Für die Untersuchung primärer Effekte von Mg-Porphyrinen auf retrograde Signalwege, sollten die RNAi-Linien zwar veränderte Porphyringehalte aufweisen, zum Zeitpunkt der Untersuchung ansonsten aber phänotypisch und makroskopisch dem Wildtyp entsprechen. Eine Voraussetzung dafür sind entsprechend vergleichbare Chlorophyllgehalte in den Pflanzen der RNAi-Linien gegenüber den Wildtyppflanzen.

3.2.4 Unveränderte Chlorophyllgehalte 24 h nach Reprimierung der *AtCHLH*-, *AtCHLD*-, *AtCHLM*- und *AtCHL27*-Expression

Die Auswirkung der veränderten Enzymaktivitäten und der Gehalte der TPBS-Intermediate auf die Chlorophyllgehalte nach Kurzzeitinduktion, wurden mittels HPLC analysiert. Dafür wurden die Chlorophyllgehalte von 14 Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen des Wildtyp und der RNAi-Linien 24 h nach DM-Behandlung bestimmt.

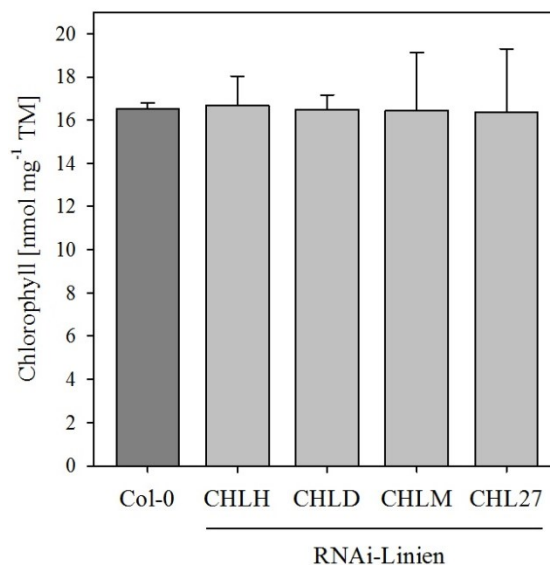


Abbildung 10: Chlorophyllgehalte der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

14 Tage alte Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j wurden pro Anzucht mit 400 μ l Dexamethason (20 μ g ml⁻¹) besprüht und der Gesamtchlorophyllgehalt nach 24 h bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte (+S.D.) von vier biologischen Replikaten.

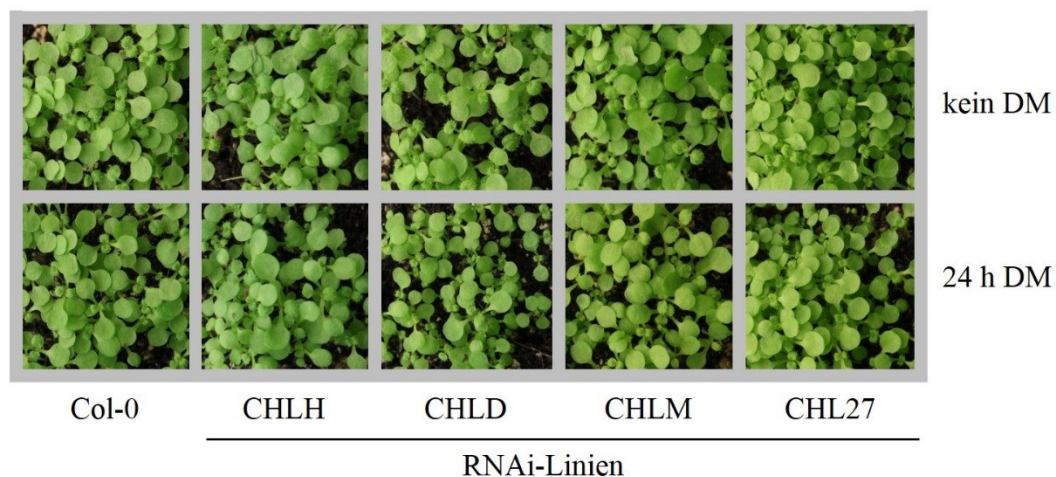


Abbildung 11: Repräsentative Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie vor und 24 h nach der Behandlung mit Dexamethason.

14 Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j wurden pro Anzucht mit 400 μ l Dexamethason (DM, 20 μ g ml⁻¹) besprüht und der Phänotyp vor und 24 h nach der Behandlung mit DM photographisch dokumentiert.

Die HPLC-Analysen 24 h nach DM-Behandlung zeigten, dass keine Unterschiede in den Chlorophyllgehalten zwischen der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM RNAi-Linie #5, CHL27-RNAi-Linie #21j und dem Wildtyp zu beobachten waren (Abbildung 10). Auch makroskopisch zeigten die Keimlinge der RNAi-Linien keine auffälligen Unterschiede des Phänotyps im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 11). Außerdem zeigte der mit DM-behandelte Wildtyp im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp keine makroskopischen Unterschiede (Abbildung 11).

3.2.5 Reduzierte ALA-Syntheseraten 24 h nach Reprimierung der Expression von *AtCHLH*-, *AtCHLD*-, *AtCHLM*- und *AtCHL27*

Die Synthese von ALA (Kapitel 1.2.1) stellt einen wesentlichen Regulationspunkt zu Beginn der TPBS dar und kann über einen *feedback*-Mechanismus aus dem Mg-Zweig der Chlorophyllbiosynthese reguliert werden (Meskauskiene *et al.*, 2001). Für die Untersuchung dieses Aspektes wurden *Arabidopsis*-Keimlinge des Wildtyp und der RNAi-Linien mit DM oder Kontrollpuffer ohne DM besprüht, die ALA-Syntheserate nach 24 h gemessen und das Verhältnis der DM-behandelten Probe zur Kontrollprobe angegeben (Abbildung 12).

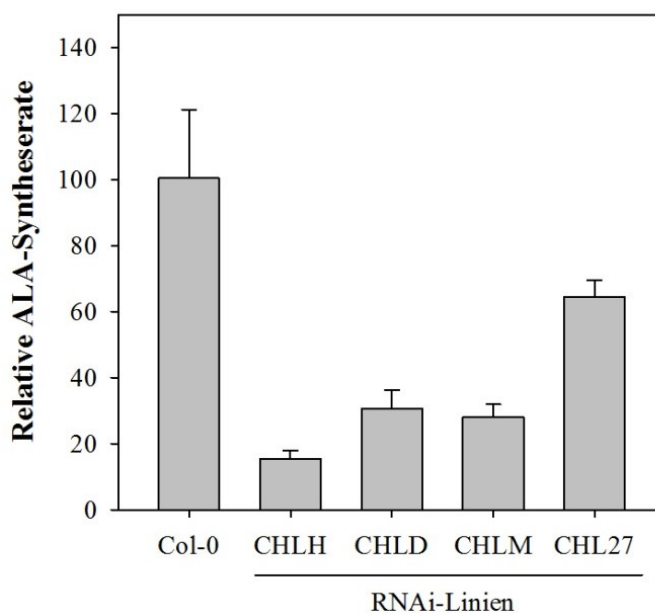


Abbildung 12: Relative ALA-Syntheserate der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

Auf Erde gewachsene 14 Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge wurden für 3 Tage im Dauerlicht akklimatisiert. Der Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j wurden pro Anzucht mit 400 µl DM (20 µg ml⁻¹) oder dem Kontrollpuffer besprüht und die ALA-Syntheserate nach 24 h bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) der relativen ALA-Syntheserate von DM-behandelten gegen Kontrollpuffer-behandelten Keimlingen der jeweiligen RNAi-Linie bzw. des Wildtyps aus sechs biologischen Replikaten.

Die Bestimmung der ALA-Syntheserate ergab reduzierte ALA-Syntheseraten aller vier RNAi-Linien 24 h nach Induktion der Geninaktivierung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12). Die Behandlung des Wildtyps mit DM hingegen führte zu keiner Veränderung der ALA-Syntheserate im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-Keimlingen (Abbildung 12) nach 24 h. Die reduzierten ALA-Syntheseraten in den vier DM-behandelten RNAi-Linien zeigten, dass modifizierte Enzymaktivitäten des Mg-Zweigs der TPBS zu einer Regulation der ALA-Synthese nach 24 h führen können. In wie weit diese Beobachtungen mit veränderten Proteingehalten korrelieren, wurde mittels Western Blot Analysen untersucht.

3.2.6 Unveränderte Gehalte der Enzyme der TPBS und Proteinen der Lichtsammelkomplexe nach Kurzzeitinduktion

Den verminderten ALA-Syntheseraten der CHLH-, CHLD, CHLM- und CHL27-RNAi-Linien können reduzierte Proteingehalte der ALA-synthetisierenden Enzyme oder posttranslationale Regulationen der Aktivitäten dieser Enzyme zu Grunde liegen. Die Synthese von ALA erfolgt durch die Enzyme GluRS, GluTR und GSAT (Kapitel 1.2.1).

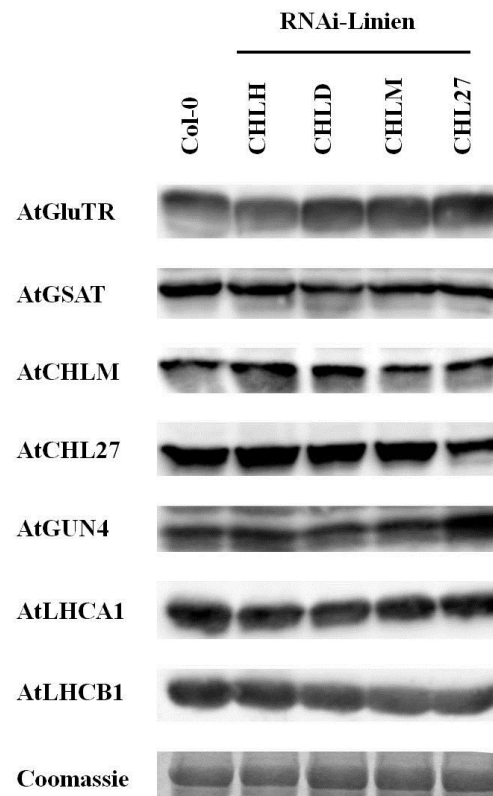


Abbildung 13: Proteingehalte von Enzymen der ALA-Synthese, des Mg-Zweigs der TPBS und Proteinen der Lichtsammelkomplexe der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie nach Kurzzeitinduktion.

Auf Erde gewachsene 14 Tage alte *Arabidopsis*-Keimlinge wurden für 3 Tage im Dauerlicht akklimatisiert und mit 400 µl DM (20 µg ml⁻¹) pro Anzucht besprüht. Nach 24 h wurden die Gehalte von verschiedenen Proteinen des Wildtyps und der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j untersucht. Gezeigt sind Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen AtGluTR, AtGSAT, AtCHLM, AtCHL27, AtGUN4, AtLHCA1 und AtLHCB1 sowie ein Coomassie-gefärbtes Gel als Ladekontrolle.

Die Abbildung 13 zeigt, dass die verringerten ALA-Syntheseraten in der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHL27-RNAi-Linie #21j (Abbildung 12) nicht auf reduzierte Gehalte an AtGluTR und AtGSAT zurückzuführen waren. Der Gehalt an AtCHLM-Protein war in der CHLM-RNAi-Linie #5 24 h nach DM-Behandlung im Vergleich zu den anderen drei RNAi-Linien und dem Wildtyp etwas vermindert (Abbildung 13). Der AtCHL27-Proteingehalt war 24 h nach Induktion der Geninaktivierung in der CHL27-RNAi-Linie #21j im Vergleich zum Wildtyp reduziert. In den CHLH-, CHLD- und CHLM-RNAi-Linien waren die Gehalte an AtCHL27 hingegen unverändert (Abbildung 13). Der Gehalt an AtGUN4 war in der CHL27-RNAi-Linie #21j nach Kurzzeitinduktion erhöht und in den anderen drei RNAi-Linien gegenüber dem

Wildtyp unverändert. Die Gehalte der Proteine der Lichtsammelkomplexe AtLHCA1 und AtLHCB1 waren in allen RNAi-Linien nach Kurzzeitinduktion gegenüber dem mit DM behandelten Wildtyp unverändert (Abbildung 13), was mit den im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls unveränderten Chlorophyllgehalten korreliert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Keimlinge der RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit DM spezifisch für das jeweilige Zielgen reduzierte Transkriptgehalte aufwiesen. Als Konsequenz verminderter Enzymaktivitäten wurden unterschiedliche *steady state*-Gehalte von Intermediaten des Mg-Zweigs der TPBS beobachtet. Außerdem wurde eine Reduktion der ALA-Syntheserate festgestellt. Als Voraussetzung für die Untersuchung primärer TP-vermittelter retrograder Signale wurde in den RNAi-Linien nachgewiesen, dass die Chlorophyllgehalte nach Kurzzeitinduktion des RNAi-Mechanismus unverändert waren. Auch waren makroskopisch keine Unterschiede zum Phänotyp des Wildtyps zu beobachten. Auf der Basis dieser Daten wurden Transkriptom-Analysen der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp 24 h nach Induktion der Geninaktivierung durchgeführt. Damit standen Expressionsdaten von *Arabidopsis*-Keimlingen zur Verfügung, die im Vergleich zum Wildtyp verringerte Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase sowie der Zyklase aufweisen und unterschiedliche Muster an *steady state*-Gehalten von Proto IX, MgP und MgPME zeigten.

Da die CHLD-RNAi-Linie #10h geringere Effekte im Vergleich zur CHLH-RNAi-Linie #8l zeigte und AtCHLD ebenfalls für eine Untereinheit der Mg-Chelatase kodiert, wurde auf eine Analyse des Transkriptoms der CHLD-RNAi-Linie #10h 24 h nach Behandlung mit DM verzichtet.

3.3 Transkriptom-Analysen nach Kurzzeitinduktion

3.3.1 Transkriptom-Analysen der RNAi-Linien 24 Stunden nach Reprimierung der Expression von AtCHLH, AtCHLM und AtCHL27

Zur Untersuchung des Einflusses veränderter Aktivitäten von Enzymen des Mg-Zweigs der TPBS und daraus resultierenden veränderten Porphyringehalten auf die Expression kerncodierter Gene wurden *microarray*-Analysen der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j im Vergleich zum mit DM-behandelten

Wildtyp durchgeführt. Es wurden jeweils von zwei unabhängigen Anzuchten RNA-Proben genommen, RNA isoliert und überprüft (Kap. 2.6.1) und zur Analyse eingeschickt (Kap. 2.6.5). Die Rohdaten der *microarray*-Analysen wurden von Christine Gläßer aus der AG Dr. Klaus Maier am Helmholtz Zentrum München, wie in Kap. 2.6.5 beschrieben, mittels der Software R ausgewertet.

3.3.2 Veränderungen der Expression kerncodierter Gene 24 Stunden nach Induktion des RNAi-Mechanismus in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie

Im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp zeigten die *microarray*-Analysen eine Vielzahl von deregulierten Genen in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie.

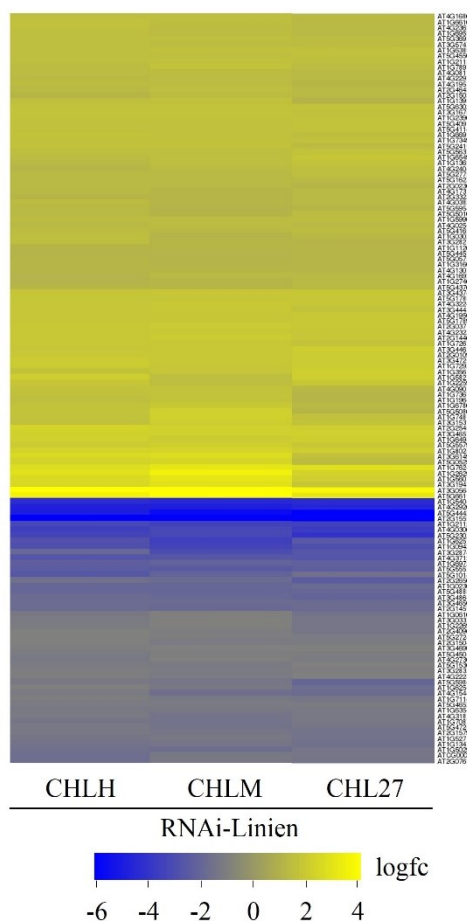


Abbildung 14: heatmap Darstellung der *microarray*-Daten von allen deregulierten Genen der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

Aufgeführt sind Gene mit mindestens zweifacher Veränderung der mRNA-Gehalte in einer der drei RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit DM im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp. Die *heatmap* stellt die logFC Werte der Gene farbkodiert für alle drei RNAi-Linien gegenüber, wobei gelb eine An- und blau eine Abreicherung der Transkripte im Vergleich zur Kontrolle aufzeigt.

Alle Gene mit mindestens zweifacher Veränderung des Transkriptgehaltes bei einem Signifikanzfaktor $p \leq 0,05$ sind Bestandteil der folgenden Auswertungen. Aus den Analysen ausgenommen ist das jeweilige RNAi-Zielgen in der entsprechenden RNAi-Linien.

In der CHLH-RNAi-Linie #8l waren 24 h nach Behandlung mit DM die Expression von 206 Genen (Anhang, Tabelle 8), in der CHLM-RNAi-Linie #5 von 188 Genen (Anhang, Tabelle 9) und in der CHL27-RNAi-Linie #21j von 206 Genen (Anhang, Tabelle 10) dereguliert. Die Tabellen geben die deregulierten Gene mit den dazugehörigen Annotationen und den Veränderungen der Transkriptgehalte als *fold change* (FC) an. Von den deregulierten Genen waren in allen drei RNAi-Linien generell mehr Gene mit erhöhten als reduzierten Transkriptmengen zu finden. Auffällig ist, dass die Veränderung der mRNA-Gehalte bezogen auf den Wildtyp in allen drei RNAi-Linien sehr ähnlich war. So zeigten, die in den drei RNAi-Linien gemeinsam deregulierten Gene eine einheitlich erhöhte bzw. verminderte Expression, was durch die Farbcodierung in der *heatmap* deutlich wird (Abbildung 14).

3.3.3 Deregulation von Genen in den CHLH-, CHLM-, CHL27- und der Kontroll-RNAi-Linie nach Kurzzeitinduktion

Um unspezifische Effekte durch die Induktion der RNAi-Repression zu überwachen, wurde eine weitere Kontrolle eingeführt. Die LUC-RNAi-Linie wurde ebenfalls mit dem pOpOff2-Vektor generiert und von Iris Finkemeier zur Verfügung gestellt. LUC kodiert in der Familie der *Lampyridae* für das Enzym Luciferase. In den Keimlingen der LUC-RNAi-Linie werden entsprechend alle Komponenten des RNAi-Systems genauso exprimiert, wie in den in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Linien. Einzige Ausnahme bildet die Resistenzkassette, die eine Selektion auf Kanamycin und nicht auf Hygromycin ermöglichte. Die LUC-RNAi-Linie wurde umfangreich analysiert und zeigte nach Behandlung mit DM keine physiologisch signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (Huang *et al.*, 2011).

Die Transkriptomanalyse der LUC-RNAi-Linie zeigte in der Gegenüberstellung mit den deregulierten Genen der CHLH-, CHLM-, CHL27-RNAi-Linien, dass es Schnittmengen von Genen gab, die in mehr als nur einer der RNAi-Linien dereguliert waren. Ein Venndiagramm fasst diese Schnittmengen zwischen der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j sowie der LUC-RNAi-Linie zusammen (Abbildung 15).

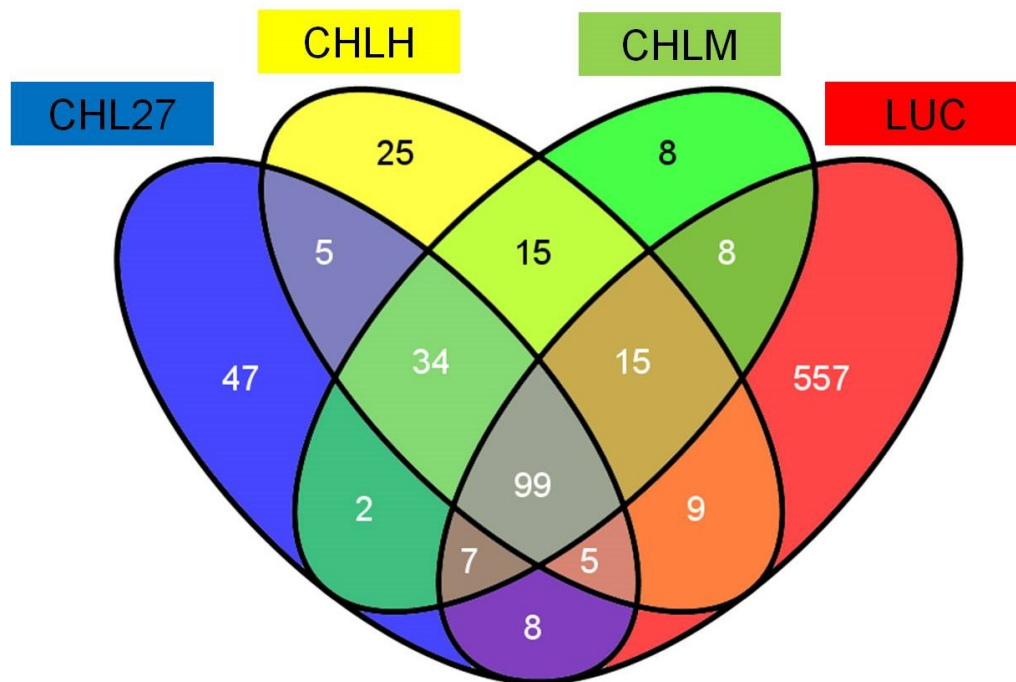


Abbildung 15: Venndiagramm zum Vergleich der deregulierten Gene der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit Dexamethason.

Vergleich aller Gene, die 24 h nach Behandlung mit DM in den RNAi-Linien eine mindestens zweifache Veränderung des Transkriptgehaltes ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp zeigten. Die Schnittmengen stellen die Anzahl der gemeinsam deregulierten Gene in den entsprechenden Linien dar. Die Schnittmenge mit 99 Genen beinhaltet beispielsweise die Gene, die in allen vier RNAi-Linien dereguliert sind. Dahingegen sind die 34 Gene ausschließlich in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie dereguliert.

Im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp war in der LUC-RNAi-Linie die Expression von 708 Genen dereguliert. Das Venndiagramm zeigt, dass es neben den Genen, die exklusiv nur in den einzelnen RNAi-Linien dereguliert waren, eine zentrale Schnittmenge von 99 Genen gibt, die in allen vier RNAi-Linien 24 h nach Induktion des RNAi-Mechanismus veränderte Transkriptgehalte aufwiesen. Außerdem gab es noch weitere Schnittmengen, die sich aus Kombinationen zwischen mindestens einer der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie und der LUC-RNAi-Linie ergaben. Zusammen waren das weitere 52 Gene, die auch in der LUC-RNAi-Linie eine im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp veränderte Expression aufwiesen. Es bleiben weitere Schnittmengen von Genen, die nicht in der LUC-RNAi-Linie, jedoch in mindestens einer der drei anderen RNAi-Linien Unterschiede im mRNA-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Abbildung 15). So gab es eine Gruppe von 34 Genen, die in der CHLH-, CHLM und CHL27-RNAi-Linie dereguliert waren. Weitere 22 Gene, die keine Deregulation in der LUC-RNAi-Linie zeigten, verteilten sich

auf die Schnittmengen von jeweils zwei der drei RNAi-Linien. Die Gene, die sich den verschiedenen Schnittmengen zuordnen lassen, sind in der Tabelle 13 (Anhang) zusammengefasst.

Der Vergleich der Gesamtanzahl deregulierter Gene in der jeweiligen RNAi-Linie zu der Anzahl an deregulierten Genen in der LUC-RNAi-Linie zeigte, dass in der CHLH-RNAi-Linie #8l ca. 62 %, in der CHLM-RNAi-Linie #5 ca. 69 % und in der CHL27-RNAi-Linie #21j ca. 57 % der deregulierten Gene auch in der LUC-RNAi-Linie veränderte mRNA-Gehalte aufwiesen. Die Gegenüberstellung der *microarray*-Daten aller vier RNAi-Linien in der *heatmap* verdeutlicht zusätzlich die Einheitlichkeit der Expressionsveränderung der Gene in den vier RNAi-Linien (Anhang, Abbildung 28). Die hohe Zahl an Genen, deren Transkriptgehalte auch in der Kontrolle eine Veränderung aufwiesen, gab einen Hinweis darauf, dass die Deregulation der meisten Gene auf einem noch nicht bekannten Mechanismus beruht.

Der direkte Vergleich der *microarray*-Daten in Form der *heatmap* zeigte die Einheitlichkeit der Veränderung der Transkriptgehalte von 99 deregulierten Genen in allen vier RNAi-Linien. Die Expression von 67 Genen war im Vergleich zum Wildtyp verstärkt und die Expression von 32 Genen war reduziert. Zusätzlich zu den 99 in allen vier RNAi-Linien deregulierten Genen waren weitere 52 Gene in mindestens einer der drei RNAi-Linien und in der LUC-RNAi-Linie dereguliert. Der Vergleich der *microarray*-Daten dieser Gene mit denen der LUC-RNAi-Linie zeigte, dass fast alle der 52 Gene in der jeweiligen RNAi-Linie gleichartig wie in der LUC-RNAi-Linie dereguliert waren (Anhang, Abbildung 29). Einzige Ausnahme bildet das Gen *AtQQS* (At3g30720) welches reduzierte mRNA-Gehalte in der CHLM- und CHL27-RNAi-Linie aufwies, in der LUC-RNAi-Linie aber einen erhöhten Transkriptgehalt hatte (Anhang, Abbildung 29). Dem ausschließlich in *Arabidopsis* vorkommenden Gen *ATQQS* wird eine Funktion bei der Kohlenstoffverteilung zwischen Stärke und Proteinen zugewiesen (Li & Wurtele, 2015).

3.3.4 Validierung der *microarray*-Daten der veränderten Genexpressionen in den RNAi-Linien mittels qRT-PCR Analysen nach Kurzzeitinduktion

Zur Kontrolle der Robustheit der *microarray*-Daten wurden einige Transkriptgehalte in den *Arabidopsis*-Keimlingen in einer von dem *microarray*-Experiment unabhängigen Anzucht überprüft.

Tabelle 5: Validierung der *microarray*-Daten mittels quantitativer RT-PCR.

Die Tabelle zeigt eine Auswahl von Genen, die 24 h nach Induktion des RNAi-Mechanismus in der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp eine veränderte Expression zeigten. Die *microarray*-Daten der CHLD-RNAi-Linie #10h wurden 6 h nach Behandlung mit DM erzeugt. Gezeigt sind die Mittelwerte der relativen Expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) von drei biologischen Replikaten der qRT-PCR Analyse 24 h nach Induktion des RNAi-Mechanismus und die entsprechenden *fold change*-Werte der *microarray*-Analysen.

| RNAi-Linien | | CHLD | | CHLH | | CHLM | | CHL27 | | LUC | |
|-------------|--|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|--------------------|---------|
| | | #10h | | #8l | | #5 | | #21j | | | |
| Gen | Beschreibung | <i>micro array</i> | qRT-PCR | <i>micro array</i> | qRT-PCR | <i>micro array</i> | qRT-PCR | <i>micro array</i> | qRT-PCR | <i>micro array</i> | qRT-PCR |
| AT3G05640 | Protein phosphatase 2C family protein | 4,21 | 23,82 | 15,73 | 20,45 | 15,37 | 16,18 | 13,26 | 8,54 | 11,81 | 17,28 |
| AT1G26290 | Unknown protein | 13,41 | 17,90 | 10,63 | 21,45 | 6,94 | 14,71 | 4,52 | 7,89 | 22,04 | 3,30 |
| AT1G76240 | Arabidopsis protein of unknown function (DUF241) | 6,66 | 15,77 | 8,48 | 12,99 | 6,26 | 10,67 | 6,61 | 7,18 | 3,90 | 3,62 |
| AT1G56010 | NAC domain containing protein 1 | 5,14 | 2,71 | 7,83 | 4,81 | 5,65 | 1,70 | 3,96 | 2,26 | 3,14 | 3,94 |
| AT3G61490 | Pectin lyase-like superfamily protein | 12,48 | 5,49 | 6,03 | 4,99 | 5,91 | 7,76 | 2,89 | 1,82 | 4,29 | 2,67 |
| AT1G80280 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 10,65 | 8,61 | 5,04 | 5,96 | 4,65 | 5,94 | 4,06 | 4,91 | 13,37 | 4,85 |
| AT1G74810 | HCO3 ⁻ transporter family | 3,51 | 56,27 | 4,38 | 18,14 | 3,09 | 33,30 | 2,76 | 14,68 | 49,79 | 17,30 |
| AT5G50800 | Nodulin MtN3 family protein | 8,00 | 10,27 | 4,21 | 11,68 | 3,08 | 6,98 | 2,08 | 3,18 | 4,07 | 7,40 |
| AT2G14460 | Unknown protein | 2,15 | 5,38 | 3,82 | 7,84 | 3,45 | 5,76 | 3,23 | 7,90 | 8,07 | 10,61 |
| AT1G72670 | IQ-domain 8 | 16,00 | 6,04 | 3,63 | 5,68 | 3,54 | 6,21 | 3,05 | 2,13 | 4,96 | 2,75 |
| AT2G14580 | basic pathogenesis-related protein 1 | 0,39 | 0,15 | 0,26 | 0,73 | 0,28 | 0,09 | 0,27 | 0,28 | 0,52 | 0,46 |
| AT1G02300 | Cysteine proteinases superfamily protein AOP2 | 0,48 | 0,25 | 0,24 | 0,23 | 0,25 | 0,24 | 0,27 | 0,23 | 0,55 | 0,26 |
| AT4G03060 | (ALKENYL HYDROXALKYL PRODUCING 2) | 0,23 | 0,04 | 0,10 | 0,05 | 0,08 | 0,02 | 0,07 | 0,02 | 0,88 | 0,59 |
| AT1G62510 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein | 0,41 | 0,22 | 0,08 | 0,22 | 0,14 | 0,24 | 0,17 | 0,31 | 0,45 | 0,34 |

Zur Validierung der *microarray*-basierten Transkriptanalysen wurden die mRNA-Gehalte von 14 willkürlich ausgewählten Genen, die 24 h nach Induktion des RNAi-Mechanismus in allen vier RNAi-Linien dereguliert waren mittels qRT-PCR in untersucht.

Die in den qRT-PCR Analysen ermittelten mRNA-Gehalte der 14 untersuchten Gene bestätigten die Daten der *microarray*-Analysen. Es gab keine Abweichungen zu der ermittelten Deregulation der Expression von Kerngenen in den *microarray*-Analysen für eine der RNAi-Linien oder für ein bestimmtes Gen. Interessanterweise waren die Veränderungen der Transkriptgehalte dieser 14 Gene auch schon nach 6 h Induktion in der CHLD-RNAi-Linie #10h zu beobachten (Tabelle 5). Weiterhin konnte in den meisten Fällen die Stärke der Deregulation der Expression der einzelnen Gene sehr gut zwischen dem Experiment der *microarray*-Analyse und dem der qRT-PCR-Analyse korreliert werden (Tabelle 5). Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte von robusten *microarray*-Daten ausgegangen und weiterführende Analysen durchgeführt werden.

3.3.5 Einheitliche Deregulation von Genen in den vier RNAi-Linien

Die modifizierte Expression vieler Gene in den RNAi-Linien nach Behandlung mit DM scheint einen gemeinsamen Ursprung zu haben, der möglicherweise auf das eingesetzte induzierbare RNAi-System zurückzuführen war. Für weitere Rückschlüsse wurden veröffentlichte *microarray*-Daten von einem Experiment mit ebenfalls induzierbaren RNAi-Linien herangezogen. Die Arbeitsgruppe um Wilhelm Gruissem hat mittels β -Estradiol-induzierbaren RNAi-System die Funktion des Proteins des Gens *AtPBR* untersucht (Borghi *et al.*, 2010). Die *microarray*-Daten wurden unter Nutzung der Software Genevestigator v.3 (Hruz *et al.*, 2008) für einen Vergleich mit den 99 in der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie deregulierten Gene herangezogen.

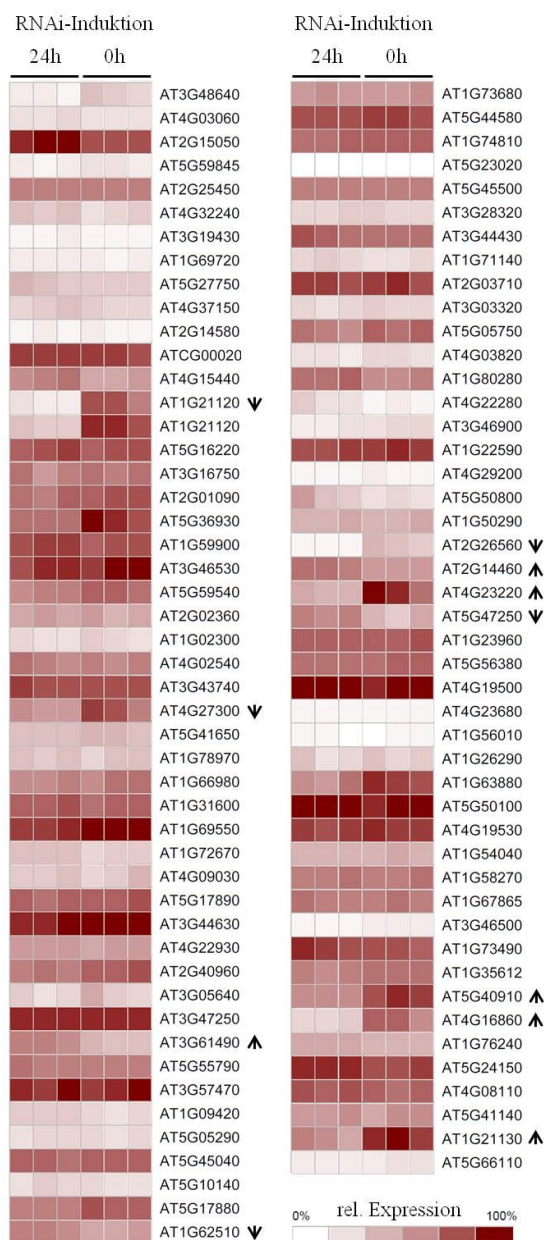


Abbildung 16: Expressionsmuster der einheitlich deregulierten Gene der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC RNAi-Linie in einem vergleichbaren Experiment.

Diese Abbildung wurde mittels Genevestigator v.3 erzeugt und zeigt *microarray*-basierte Expressionsdaten (Borghi *et al.*, 2010). Gezeigt ist die relative Expression von drei Replikaten vor und 24 h nach der Induktion des RNAi-Systems mit β -Estradiol. Von den 99 gemeinsam deregulierten Genen (Abbildung 15) wurden 95 Gene in der Datenbank gefunden. Die Pfeile markieren die deregulierten Gene nach 24 h β -Estradiol-Behandlung und geben die Art der Deregulation in den DM-induzierbaren RNAi-Linien an.

Ein Vergleich der *microarray*-Daten mit denen des β -Estradiol-induzierten RNAi-Systems zeigt, dass 11 der 95 analysierten Gene auch in diesem System 24 h nach Induktion dereguliert sind (Abbildung 16). Davon sind wiederum 5 von 11 Genen in gleicher Weise dereguliert wie in den vier RNAi-Linien aus der vorliegenden Arbeit. Insgesamt deutet

dieser Vergleich darauf hin, dass das RNAi-System selbst, welches nach Behandlung mit dem Induktionsmittel exprimiert wird, nicht die Ursache der veränderten Expression ist.

3.3.6 Analyse der Transkriptgehalte von PhANGs, TPBS-Genen und ROS-Markergenen 24 h nach Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27*

Zur weiterführenden Analyse wurden die deregulierten Gene (Tabelle 8-10) mit bekannten Markergenen für retrograde Signale wie PhANGs abgeglichen. Die Gruppe der PhANGs repräsentiert retrograde Zielgene, deren Expression vom physiologischen Status abhängt und sehr genau mit der Genexpression der Chloroplasten abgestimmt wird, um die Funktionalität der Photosysteme und der plastidären Stoffwechselwege zu gewährleisten.

In der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j waren keine Gene dereguliert, die sich der Gruppe der PhANGs zuordnen lassen. Dementsprechend wurden keine Veränderungen der Transkriptgehalte gegenüber dem DM-behandelten Wildtyp der klassischen retrograden Markergene wie *AtLHCB1.2* (At1g29910) oder *AtRBCS* (At1g67090) in den RNAi-Linien beobachtet. Gleiches galt für weitere Vertreter der PhANGs wie *AtCPI2* (At3g62410), *AtPLASTOCYANIN 1* (At1g76100) und *AtCA1* (At3g01500) (Woodson *et al.*, 2011).

Des Weiteren wurden keine Veränderungen der mRNA-Gehalte von Genen der TPBS als Folge von verminderten Enzymaktivitäten in der CHLH-, CHLM- oder CHL27-RNAi-Linie 24 h nach Induktion festgestellt. So waren beispielsweise die mRNA-Gehalte der TPBS-Gene *AtHEMA1*, *AtGUN4*, *AtFC1* und *AtPORB* in den drei RNAi-Linien im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp unverändert. Generell war die Expression von Genen der TPBS 24 h nach Behandlung mit DM in den drei RNAi-Linien unverändert.

Außerdem zeigten typische ROS-Markergene wie *AtFSD1* (At4g25100) und *AtGPX7* (At4g31870) sowie *AtBAP1* (At3g61190) und *AtZAT12* (At5g59820) (Baruah *et al.*, 2009) keine Erhöhung der Transkriptgehalte 24 h nach Behandlung mit DM.

Generell konnte festgestellt werden, dass bei keinem der deregulierten Gene eine bekannte Verbindung zur TPBS, zu assoziierten Stoffwechselwegen oder zur intrazellulären Signalgebung zuzuordnen war.

3.3.7 Gene von Stress- und Abwehrantworten sind überrepräsentiert in der Gruppe der 99 einheitlich deregulierten Gene in der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie

Zur Vereinheitlichung des Vokabulars und funktionellen Annotation von Genen oder Proteinen wurden definierte GO-Terminologien (*Gene Ontology*) in den Biowissenschaften eingeführt, welche in Datenbanken verwaltet und kontinuierlich weiter entwickelt werden. Zur Analyse solcher Daten stehen wiederum Programme zur Verfügung, die die Häufigkeiten von GO-Annotationen zwischen zwei Gruppen von Genen vergleichen. Diese Daten können dabei helfen, Rückschlüsse auf spezifische Zusammenhänge zwischen der Ursache einer angepassten Expression von Kerngenen und einer speziellen Gruppe von Genen zu erhalten. So können beispielsweise die Gene, welche exklusiv in der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j dereguliert waren, auf repräsentative Gruppen untersucht werden. Die Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der GO-Analyse mittels GORILLA (*Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool*) zusammen (Eden *et al.*, 2007; Eden *et al.*, 2009). Als Bezugsgruppe wurden die *Arabidopsis* Gene, die auf dem ATH1 *microarray chip* repräsentiert waren, eingesetzt.

Die Analyse der GO-Daten zeigte, dass unter den 25 Genen, die ausschließlich in der CHLH-RNAi-Linie #8l dereguliert waren, eine Gruppe von Genen mit der GO-Annotation *membrane* und *plasma membrane* überrepräsentiert war (Tabelle 6). Da diese GO-Annotationen bezüglich der Lokalisation von Genprodukten nur eine sehr allgemeine Zuordnung ermöglicht, lässt sich aus dieser Überrepräsentation keine unmittelbare Korrelationen zwischen der spezifischen Repression von *AtCHLH* und retrograder Signalwege ableiten.

Unter den 34 Genen, die eine veränderte Expression in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie aufwiesen, zeigte sich eine überrepräsentierte Gruppe, denen die GO-Annotation *defense response* zugeordnet wurde. Dieselbe GO-Annotation wurde den 99 Genen, die in allen vier RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit DM veränderte Transkriptgehalte aufwiesen, zugeordnet. Zusätzlich war noch eine weitere Gruppe von Genen überrepräsentiert, denen die GO-Annotation *response to stress* zugeordnet wurde (Tabelle 6). Auch hier können diese GO-Annotationen keine spezifischen Verbindungen zwischen möglichen retrograden Signalen und spezielle biologische Prozesse zu.

Tabelle 6: GO-Analyse von Genen mit deregulierter Expression in mindestens einer der untersuchten RNAi-Linien.

Die Analyse wurde mittels GORILLA durchgeführt. Als Bezugsgruppe wurden die auf dem *microarray chip* ATH1 repräsentierten Gene gewählt. Annotationen, die in der Vergleichsgruppe gegenüber der Bezugsgruppe überrepräsentiert waren ($p < 0,001$), wurden mit der GO-Nummer und der entsprechenden Bezeichnung der jeweiligen GO-Kategorie angegeben. Es wurde nach den Kategorien biologischer Prozess (*GO process*), Funktion (*GO function*) und Lokalisation (*GO component*) unterschieden.

| Vergleichsgruppe | GO process | GO function | GO component |
|---|---|---------------------------------------|--|
| 25 Gene, die exklusiv in CHLH-RNAi-Linie #8l dereguliert waren | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert | GO:0016020 <i>membrane</i> (p=6.38E-5) GO:0005886 <i>plasma membrane</i> (p=3.96E-4) |
| 8 Gene, die exklusiv in CHLM-RNAi-Linie #5 dereguliert waren | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert |
| 47 Gene, die exklusiv in CHL27-RNAi-Linie #21j dereguliert waren | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert |
| 34 Gene, die in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie dereguliert waren | GO:0006952 <i>defense response</i> (p=3.12E-4) | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert |
| 99 Gene, die in der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie dereguliert waren | GO:0006952 <i>defense response</i> (p=1.38E-6) GO:0006950 <i>response to stress</i> (p=5.9E-4) | keine Annotation überrepräsentiert | keine Annotation überrepräsentiert |

Alle weiteren Vergleiche zeigten keine weiteren Überrepräsentationen von GO-Annotationen (Tabelle 6). Auch die Analysen von GO-Daten bezogen auf andere Vergleichsgruppen (Daten nicht gezeigt), wie z. B. die deregulierten Gene der LUC-RNAi-Linie, konnten keine zusätzlichen Hinweise über die physiologische Relevanz der Deregulation bestimmter Gene liefern.

3.3.8 Expressionsanalyse der 34 gemeinsam deregulierten Gene in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie

In der Tabelle 7 sind die 34 Gene, die in der CHLH-RNAi-Linie#8l, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j dereguliert sind und deren jeweilige *fold change*-Werte dargestellt. Für eine mögliche Interpretation der Funktion der Genprodukte dieser Gene war

es wichtig zu wissen, ob eine Verstärkung oder Verminderung der Expression als mögliche Folge von Veränderungen in der TPBS zu beobachten waren. Bemerkenswert ist, dass die *fold change*-Werte der LUC-RNAi-Linie darauf hinweisen, dass für den Großteil der 34 Gene die gleiche Tendenz der Deregulation bestand (Tabelle 7).

Tabelle 7: Die *fold change*-Werte der 34 gemeinsam deregulierten Gene in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie.

Zusätzlich sind die *fold change*-Werte der LUC-RNAi-Linie unabhängig vom pval in hellgrau dargestellt

| AGI | Beschreibung | CHLH | CHLM | CHL27 | LUC |
|-----------|--|------|------|-------|------|
| AT3G15310 | <i>transposable element gene</i> | 4,14 | 2,88 | 3,03 | 1,11 |
| AT1G72920 | <i>Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein</i> | 3,22 | 3,78 | 3,68 | 1,78 |
| AT1G19640 | <i>jasmonic acid carboxyl methyltransferase</i> | 3,15 | 2,73 | 2,13 | 1,24 |
| AT5G63020 | <i>Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family</i> | 3,04 | 3,05 | 3,08 | 1,64 |
| AT1G13950 | <i>eukaryotic elongation factor 5A-1</i> | 2,88 | 2,59 | 2,02 | 2,11 |
| AT1G13650 | <i>Unknown protein</i> | 2,72 | 2,24 | 3,09 | 3,64 |
| AT1G66100 | <i>Plant thionin</i> | 2,63 | 2,75 | 2,24 | 8,10 |
| AT2G46450 | <i>cyclic nucleotide-gated channel 12</i> | 2,61 | 2,23 | 2,27 | 1,63 |
| AT1G65490 | <i>Unknown protein</i> | 2,58 | 2,48 | 3,18 | 2,84 |
| AT4G24040 | <i>trehalase 1</i> | 2,45 | 2,10 | 2,74 | 0,49 |
| AT4G16950 | <i>Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family</i> | 2,27 | 2,06 | 2,28 | 2,28 |
| AT2G33220 | <i>GRIM-19 protein</i> | 2,21 | 2,18 | 2,29 | 1,85 |
| AT1G27460 | <i>no pollen germination related 1</i> | 2,20 | 2,01 | 2,32 | 1,36 |
| AT4G17370 | <i>Oxidoreductase family protein</i> | 2,20 | 2,23 | 2,33 | 2,64 |
| AT4G13050 | <i>Acyl-ACP thioesterase</i> | 2,17 | 2,07 | 2,09 | 1,94 |
| AT3G28270 | <i>Protein of unknown function (DUF677)</i> | 2,17 | 2,67 | 2,02 | 2,71 |
| AT5G43760 | <i>3-ketoacyl-CoA synthase 20</i> | 2,15 | 2,10 | 2,29 | 1,89 |
| AT1G11260 | <i>sugar transporter 1</i> | 2,07 | 2,03 | 2,18 | 1,23 |
| AT1G03020 | <i>Thioredoxin superfamily protein</i> | 2,05 | 2,67 | 2,22 | 1,42 |
| AT1G06160 | <i>octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF 59</i> | 0,50 | 0,39 | 0,35 | 0,46 |
| AT1G22690 | <i>Gibberellin-regulated family protein</i> | 0,49 | 0,41 | 0,38 | 0,60 |
| AT5G27240 | <i>DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein</i> | 0,46 | 0,48 | 0,42 | 0,47 |
| AT5G46520 | <i>Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family</i> | 0,41 | 0,42 | 0,42 | 0,78 |
| AT5G15360 | <i>Unknown protein</i> | 0,41 | 0,42 | 0,49 | 0,60 |
| AT1G63540 | <i>hydroxyproline-rich glycoprotein family protein</i> | 0,40 | 0,39 | 0,38 | 0,67 |
| AT1G52770 | <i>Phototropic-responsive NPH3 family protein</i> | 0,38 | 0,36 | 0,34 | 0,44 |
| AT1G62540 | <i>flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 2</i> | 0,38 | 0,47 | 0,31 | 0,81 |
| AT1G13470 | <i>Protein of unknown function (DUF1262)</i> | 0,37 | 0,35 | 0,32 | 0,30 |
| AT2G15790 | <i>cyclophilin-40 (CYP40) / rotamase</i> | 0,37 | 0,39 | 0,34 | 0,53 |
| AT1G70870 | <i>lipid transport superfamily protein</i> | 0,35 | 0,36 | 0,40 | 0,57 |
| AT4G31870 | <i>glutathione peroxidase 7</i> | 0,34 | 0,43 | 0,40 | 0,53 |
| AT5G48850 | <i>Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein</i> | 0,24 | 0,24 | 0,25 | 0,85 |
| AT3G28740 | <i>Cytochrome P450 superfamily protein</i> | 0,12 | 0,26 | 0,16 | 0,59 |
| AT5G44420 | <i>plant defensin 1</i> | 0,02 | 0,03 | 0,01 | 0,17 |

Zur weiterführenden Analyse der 34 Gene wurden die *microarray*-Daten mit denen anderer veröffentlichter Experimente verglichen. Dazu wurde die Software Genevestigator v.3 (Hruz *et al.*, 2008; Zimmermann *et al.*, 2008) eingesetzt, die als Plattform alle von der wissenschaftliche Gemeinde zur Verfügung gestellten *microarray*-Daten beinhaltet.

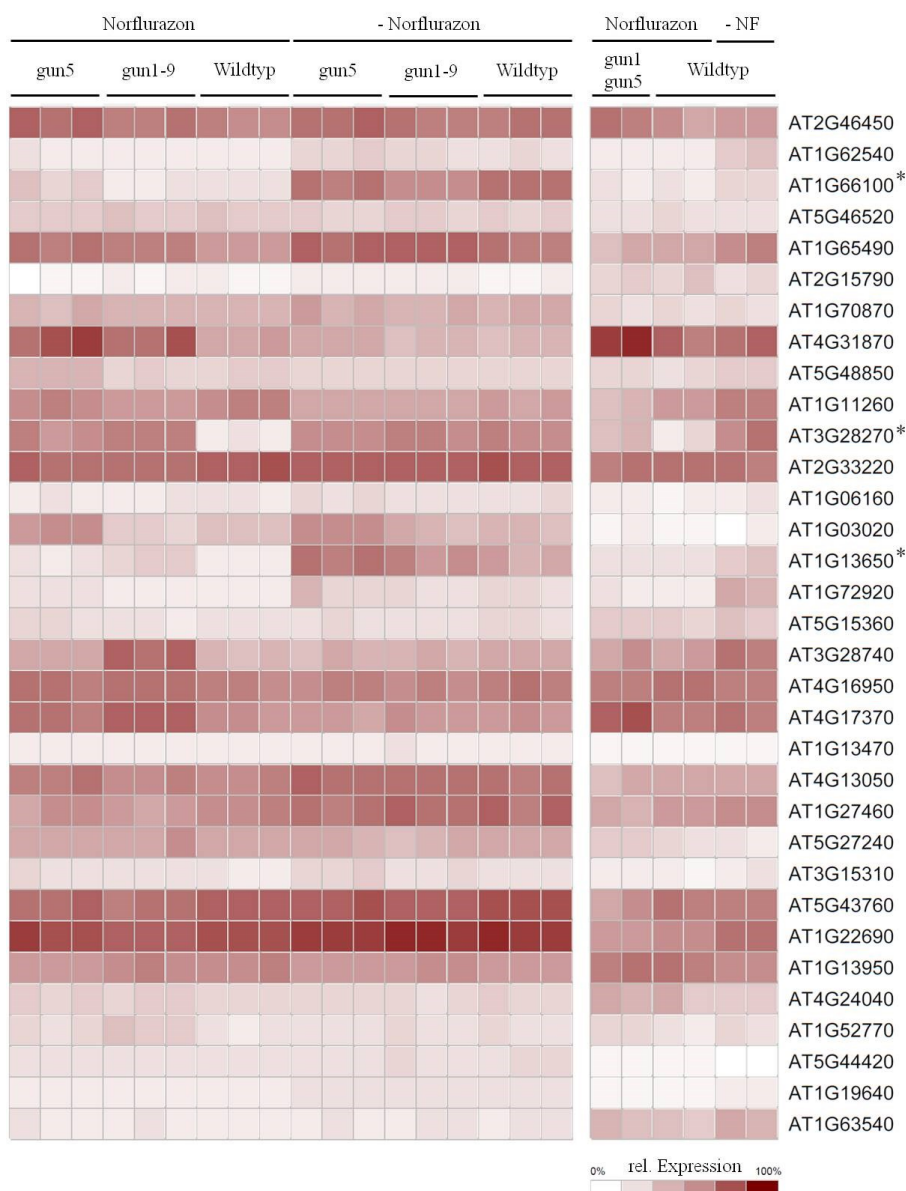


Abbildung 17: Expressionsmuster der 34 einheitlich deregulierten in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie in *gun*-Mutanten mit und ohne Behandlung von Norflurazon

Diese Abbildung wurde mittels Genevestigator v.3 erzeugt und zeigt *microarray*-basierte Expressionsdaten. Gezeigt ist auf der linken Seite die relative Expression von Genen in der *gun5* und *gun1-9*-Mutante sowie im Wildtyp mit und ohne NF-Behandlung. Auf der rechten Seite ist die relative Expression der *gun5:gun1-9* Doppelmutante und dem Wildtyp mit und ohne NF-Behandlung gezeigt. Von den 34 gemeinsam deregulierten Genen in der CHLH-, CHLM- und CHL27 RNAi-Linie (Abbildung 15) wurden 33 Gene in der Datenbank gefunden. Die Sterne markieren die Gene welche nach NF-Behandlung in mindestens einer der *gun*-Mutanten eine schwächere Repression der Expression im Vergleich zum Wildtyp zeigen.

Abbildung 17 zeigte Expressionsdaten von Experimenten mit *gun*-Mutanten, die ausschließlich in der Datenbank von Genevestigator v.3 zu finden waren. Keines der analysierten gemeinsam in der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie deregulierten Gene (Tabelle 7) zeigte in der *gun5*-, *gun1-9*- oder *gun1:gun5*-Mutante eine veränderte Expression im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem zeigten nur die drei mit Sternchen markierten Gene nach NF-Behandlung eine schwächere Repression der Expression im Vergleich zum NF-behandelten Wildtyp (Abbildung 17), was auf einen Gun-Phänotyp hinweist.

3.4 Untersuchung der Folgen einer Langzeitinduktion

Nachdem die Ergebnisse der Kurzzeitinduktion von 24 h DM-Behandlung keine Hinweise auf eine durch Porphyrine veränderte Expression von Kerngenen ergaben, sollten die Konsequenzen der Geninaktivierung nach bis zu vier Tagen Behandlung mit DM untersucht werden. Im Folgenden wird in diesem Zusammenhang immer von der Langzeitinduktion geschrieben. Dafür wurde der experimentelle Ansatz angepasst und die Pflanzen für diese Experimente ausschließlich auf MS-Platten, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, angezogen. Zur Induktion der Geninaktivierung wurden die Keimlinge auf MS-Platten mit 20 µg ml⁻¹ Dexamethason überführt. Auf diese Weise konnte ein robuster experimenteller Ansatz geschaffen werden, der eine entsprechend gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimente zulässt.

3.4.1 Phänotypen der RNAi-Pflanzen nach Langzeitinduktion

In einem ersten Experiment wurden die Veränderungen des Phänotyps als Konsequenz der Langzeitinduktion untersucht. Dazu wurden Keimlinge der vier RNAi-Linien und des Wildtyps auf MS-Nährmedium mit und ohne DM transferiert und die Phänotypen fotografisch dokumentiert (Abbildung 18). Der Transfer der Keimlinge führte zu keinerlei Beeinträchtigung der weiteren Entwicklung der Pflanzen (Abbildung 18 A – C). Die CHLH-RNAi-Linie #8l und die CHLD-RNAi-Linie #10h zeigten nach vier Tagen Behandlung mit DM einen deutlichen chlorotischen Phänotyp, der sich nach bereits zwei Tagen ausbildet (Abbildung 18 E, F). Die Ausprägung der Chlorosen war bei der CHLH-RNAi-Linie #8l jedoch intensiver als bei der CHLD-RNAi-Linie #10h (Abbildung 18 F). Die CHLM-RNAi-Linie #5 zeigte im Vergleich zum Wildtyp nach vier Tagen DM-Behandlung einen leicht hellgrünen Phänotyp. Das Wachstum der CHL27-RNAi-Linie #21j war unter Behandlung mit DM etwas reduziert und zeigte nach vier Tagen Behandlung mit DM stark nekrotische

Blätter (Abbildung 18 E, F). Insgesamt liessen sich entsprechend drei verschiedene Phänotypen beobachten. Für eine weitere Charakterisierung der Keimlinge nach Langzeitinduktion wurden u.a. die Gehalte an Metaboliten des Mg-Zweigs bestimmt und Transkriptanalysen durchgeführt.

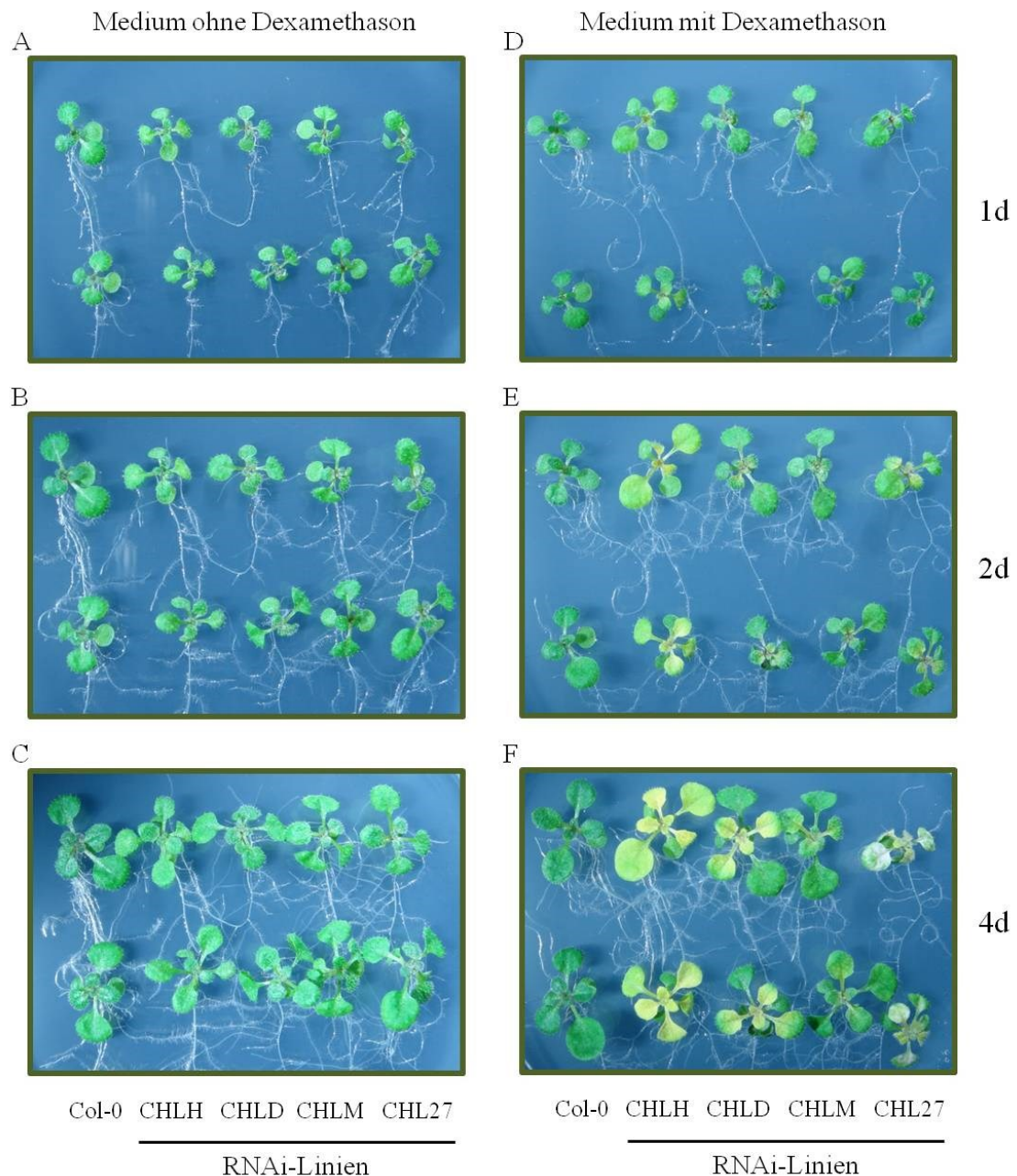


Abbildung 18: Repräsentative RNAi-Pflanzen nach Langzeitinduktion auf MS-Nährmedium mit Dexamethason.

Keimlinge der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j wurden nach 10 Tage auf MS-Platten mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DM überführt. Anschließend wurde der Phänotyp nach 1, 2 und 4 Tage dokumentiert. Als Kontrolle wurden zeitgleich Keimlinge auf MS-Platten ohne DM überführt und herangezogen. Die Keimlinge wuchsen unter $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Photonen bei 21°C .

3.4.2 Kinetik der Metabolitgehalte des Mg-Zweigs der TPBS während der Langzeitinduktion

Die Messung der Gehalte der Metabolite des Mg-Zweigs der TPBS sollte klären, wie sich die *steady state*-Gehalte der Porphyrine während einer vier Tage anhaltenden Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* bzw. *AtCHL27* verhalten. Die Gehalte an Proto IX waren während der Behandlung mit DM in den vier RNAi-Linien weitestgehend stabil (Abbildung 19 A). Lediglich in den Keimlingen der CHL27-RNAi-Linie #21j, die nach vier Tagen Blattnekrosen aufwiesen, war eine Verminderung der Gehalte an Proto IX um mehr als 50 % im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen zu beobachten (Abbildung 19 A). In den Keimlingen der CHLH-RNAi-Linie #8l waren bereits nach eintägiger DM-Behandlung keine Gehalte an MgP, MgPME und Pchlid detektierbar. Diese Beobachtung setzte sich auch nach zwei und vier Tagen fort und korrelierte mit den chlorotischen Phänotyp der Keimlinge (Abbildung 19 B – D). Interessanterweise waren in den weniger stark chlorotischen Keimlingen der CHLD-RNAi-Linie #10h die Gehalte an MgP, MgPME und Pchlid im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen unverändert (Abbildung 18 und Abbildung 19 B – D). Die verminderte Expression von *AtCHLM* in den Keimlingen der CHLM-RNAi-Linie #5 führte zu einer Erhöhung der Gehalte an MgP nach zwei- und viertägiger Behandlung mit DM (Abbildung 19 B). Die Gehalte der Folgeintermediate MgPME und Pchlid waren hingegen im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen jedoch unverändert. In den Keimlingen der CHL27-RNAi-Linie #21j führte die Reprimierung der Expression von *AtCHL27* nach zwei Tagen zu einer starken Erhöhung der Gehalte an MgP und MgPME im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen, die in den ausgeprägt Blattnekrosen aufweisenden Keimlingen nach viertägiger DM-Behandlung ebenfalls wieder vermindert waren (Abbildung 19 B, C). Die Gehalte an Pchlid nahmen in den Keimlingen der CHL27-RNAi-Linie #21j mit Dauer der DM-Behandlung ab und waren nach vier Tagen nicht mehr detektierbar (Abbildung 19 D). Die DM-Behandlung der Wildtyp-Keimlinge führte im Wesentlichen zu keinen Veränderungen der Gehalte an Proto IX, MgP, MgPME und Pchlid im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen.

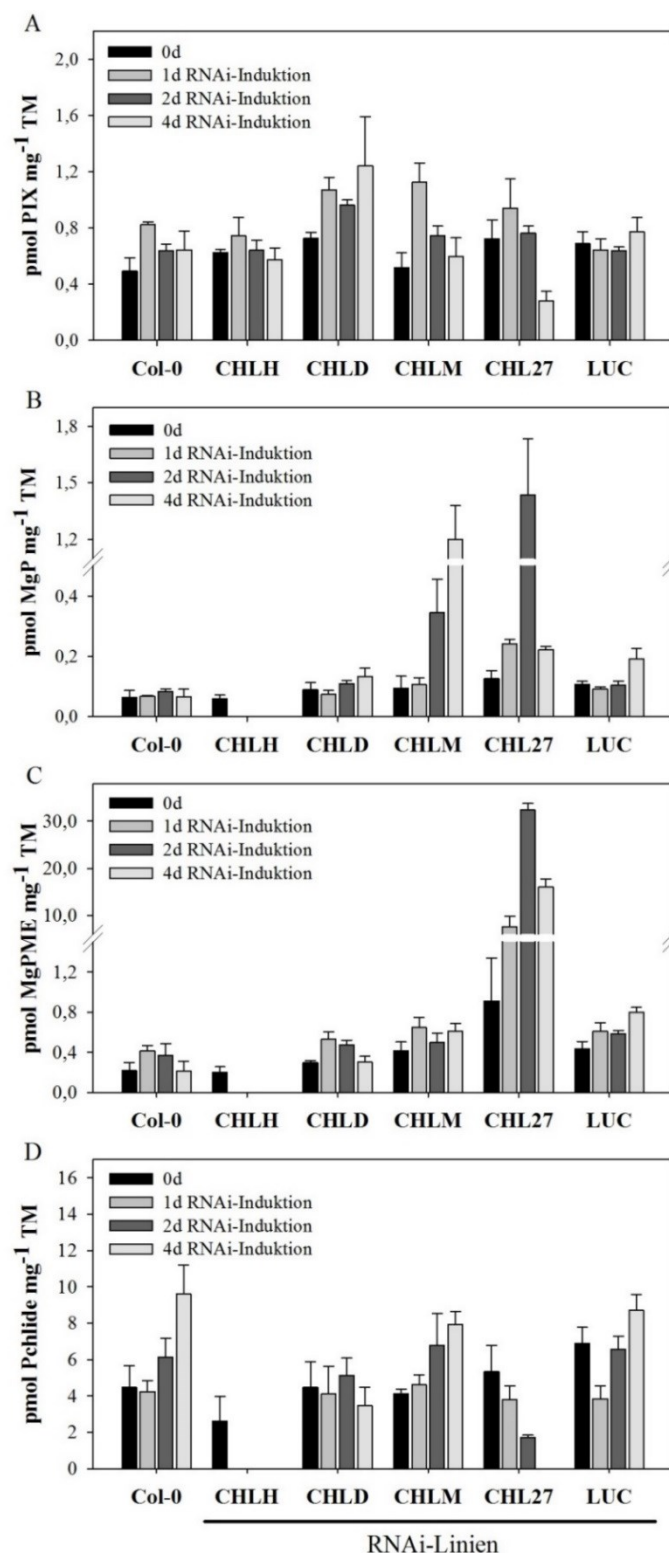


Abbildung 19: Kinetik der Metabolitgehalte von Intermediaten des Mg-Zweigs der TPBS nach Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27*.

Es wurden Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5, CHL27-RNAi-Linie #21j sowie die LUC-RNAi-Linie zeitlich versetzt auf MS-Platten mit 20 µg ml⁻¹ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Aus dem gefriergetrockneten Pflanzenmaterial wurden acetonsche Extrakte hergestellt und mittels HPLC analysiert. Die Abbildung zeigt den Gehalt an Proto IX (A), MgP (B), MgPME (C) und Pchlid (D) bezogen auf die Trockenmasse (TM). Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten.

Außerdem wurde in diesem Experiment die LUC-RNAi-Linie untersucht, um eine mögliche artifizielle Veränderung der Metabolite des Mg-Zweigs der TPBS in den Keimlingen dieser Kontrolllinie nach Behandlung mit DM auszuschließen. Genau wie bei den Keimlingen des *Arabidopsis*-Wildtyp liessen sich über die Dauer der DM-Behandlung von vier Tagen keine wesentlichen Veränderungen in den Gehalten von Proto IX, MgP, MgPME und Pchlid im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen feststellen.

3.4.3 Chlorophyllgehalte nach viertägiger Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27*

Da die Konsequenzen der Reprimierung von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* bei den entsprechenden Keimlingen deutlich sichtbar waren (Abbildung 18), sollten mit der Messung der Chlorophyllgehalte vor allem Erkenntnisse über die Mengenverhältnisse von Chlorophyll *a* und *b* gewonnen werden. Der Gesamtchlorophyllgehalt der Keimlinge der *CHLH*-RNAi-Linie #8l nahm mit zunehmender Dauer der Reprimierung der Expression von *AtCHLH* ab. Nach vier Tagen Behandlung mit DM lag der Gesamtchlorophyllgehalt noch bei ca. 60 % im Vergleich zum Gehalt in unbehandelten Keimlingen (Abbildung 20 A). Außerdem zeigte die *CHLH*-RNAi-Linie als einzige RNAi-Linie eine Veränderung des Chlorophyll *a/b* Verhältnisses, welches nach viertägiger DM-Behandlung stark zu Gunsten von Chlorophyll *a* verschoben war (Abbildung 20 B). Im Vergleich zur *CHLH*-RNAi-Linie #8l wiesen die leicht chlorotischen Keimlinge der *CHLD*-RNAi-Linie #10h eine geringere Reduktion des Chlorophyllgehaltes relativ zu den unbehandelten Keimlingen auf (Abbildung 20 A). Die Verminderung des Chlorophyllgehaltes der *CHLD*-RNAi-Linie #10h war mit der der *CHLM*-RNAi-Linie #5 vergleichbar (Abbildung 20 A), deren Keimlinge nach viertägiger Reprimierung von *AtCHLM* einen leicht hellgrünen Phänotyp aufwiesen (Abbildung 18). Beide Linien zeigten keine Veränderungen des Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses nach Langzeitinduktion (Abbildung 20 B). Die Keimlinge der *CHL27*-RNAi-Linie #21j zeigten, entsprechend ihrer Nekrosen, einen stark verminderten Gehalt an Chlorophyll von weniger als 40 % im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen (Abbildung 20 A). Das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis war über den gesamten Zeitraum der DM-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen unverändert.

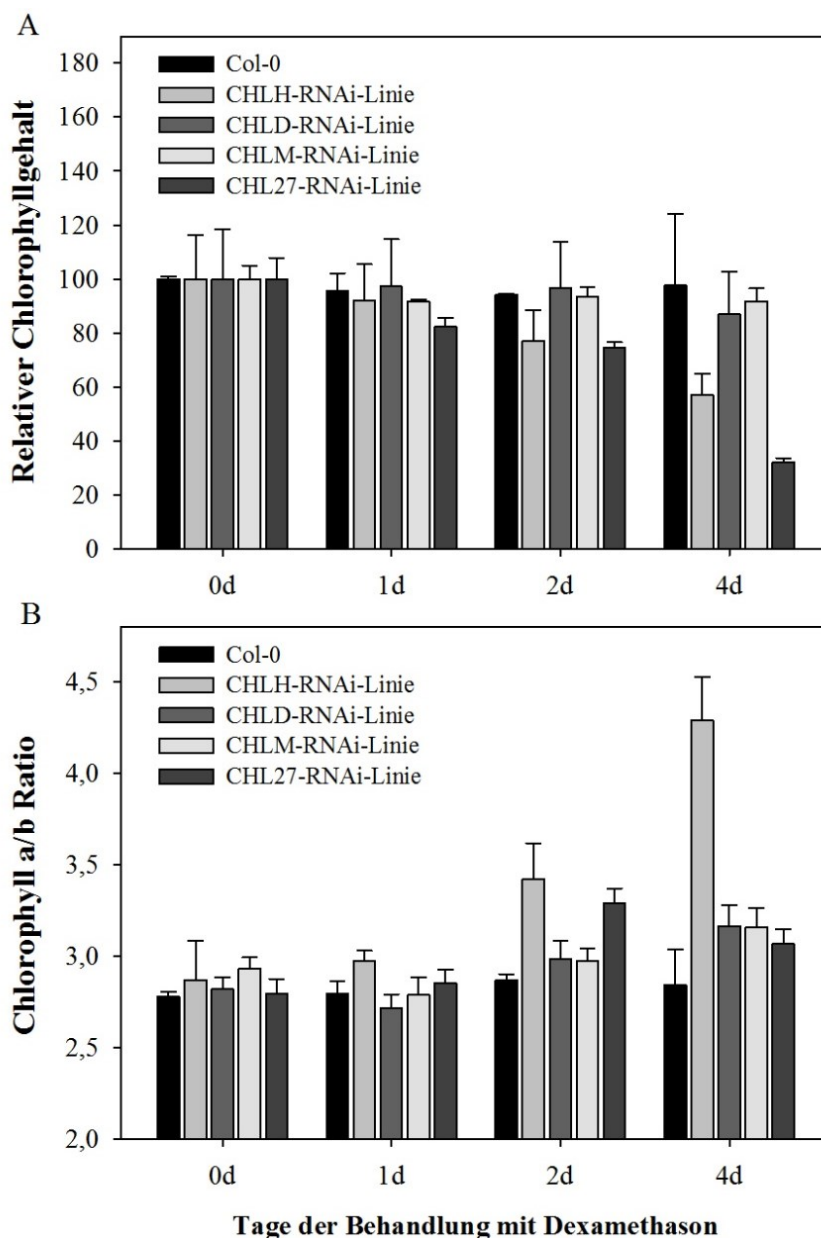


Abbildung 20: Kinetik der Gehalte von Chlorophyll *a/b* nach Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27*.

Es wurden Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Aus dem gefriergetrockneten Pflanzenmaterial wurden acetonische Extrakte hergestellt und mittels HPLC analysiert. Die Abbildung zeigt den relativen Gehalt an Chlorophyll *a/b* im Vergleich zu den Gehalten in den jeweiligen unbehandelten Keimlingen (A) sowie das Verhältnis der Gehalte von Chlorophyll *a* zu *b* (B). Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten.

3.4.4 Auswirkungen der Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* auf andere Bereiche der Chlorophyllbiosynthese

Da die Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* keine drastischen Veränderungen des Gehaltes an Proto IX verursacht hatte (Abbildung 19 A), sollte untersucht werden, wie weit der Fe-Zweig der TPBS, insbesondere der Hämgehalt, beeinflusst wurden.

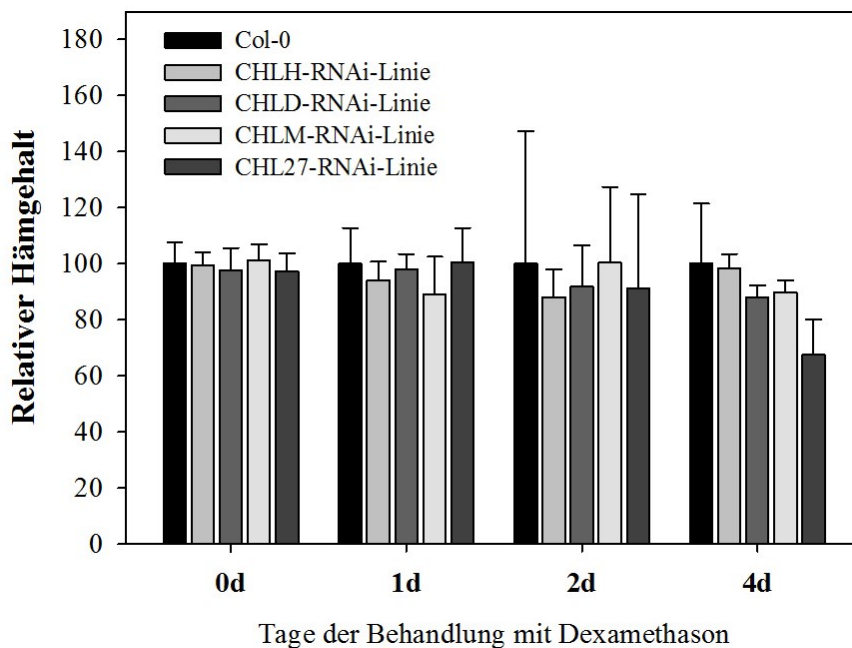


Abbildung 21: Kinetik der Hämgehalte nach Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27*.

Es wurden Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Aus dem gefriergetrockneten Pflanzenmaterial wurden Extrakte hergestellt und mittels HPLC analysiert. Die Abbildung zeigt den relativen Hämgehalt im Vergleich zu den Gehalten in den jeweiligen unbehandelten Keimlingen. Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten.

Alle vier RNAi-Linien wiesen keine veränderten Hämgehalte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf (Abbildung 21). Lediglich die stark nekrotischen Keimlinge der CHL27-RNAi-Linie #21j zeigten nach viertägiger DM-Behandlung leicht reduzierte Hämgehalte (Abbildung 21). Da eine mögliche Kanalisierung von Proto IX in den Fe-Zweig der TPBS nicht zu einer Erhöhung der *steady state*-Gehalte an Häm führt, sollte die Messung der ALA-Synthesekapazität Informationen über die Aktivität der initialen Enzyme der TPBS liefern.

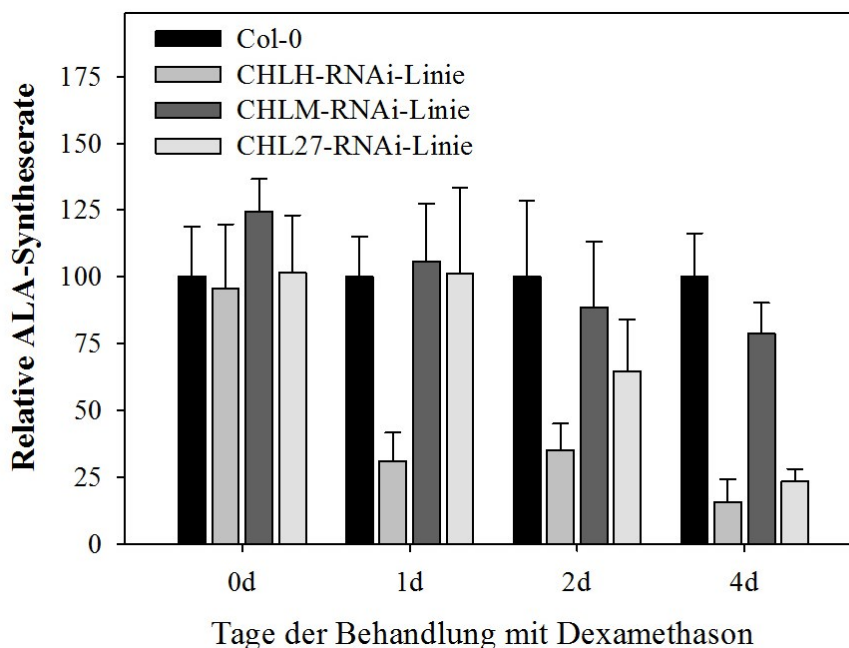


Abbildung 22: Kinetik der ALA-Syntheserate nach Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27*.

Es wurden Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Die Abbildung zeigt die relative ALA-Synthesekapazität der einzelnen RNAi-Linien im Vergleich zum Wildtyp zum jeweiligen Zeitpunkt. Dargestellt sind Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten.

Die CHLH-RNAi-Linie #8l zeigte schon nach einem Tag Reprimierung der Expression von *AtCHLH* eine stark reduzierte ALA-Synthesekapazität im Vergleich zum DM-behandelten *Arabidopsis*-Wildtyp. Nach viertägiger DM-Behandlung waren weniger als 25 % der ALA-Synthesekapazität im Vergleich zum Wildtyp gemessen worden (Abbildung 22). Die CHLM-RNAi-Linie #5 zeigte mit zunehmender Dauer der DM-Behandlung eine leichte Reduzierung der ALA-Synthesekapazität. Nach viertägiger DM-Behandlung wies sie etwa 75 % des Wildtyp-Niveaus auf (Abbildung 22). Die CHL27-RNAi-Linie #21j zeigte nach einem Tag noch keine Veränderung der ALA-Synthesekapazität. Diese war jedoch nach zwei Tagen auf unter 75 % und nach vier Tagen DM-Behandlung auf unter 25 % des Wildtyp-Niveaus gesunken (Abbildung 22).

3.4.5 Transkriptanalysen repräsentativer PhANGs, Markergene für ROS und regulatorisch relevanter Gene der Tetrapyrrolbiosynthese während der Langzeitinduktion

Als Folge anhaltender verminderter Aktivität der Enzyme des Mg-Zweigs der TPBS, Mg-Chelatase, Methyltransferase und Zyklastase, wurden in den jeweiligen RNAi-Linien verschiedene Muster von *steady-state*-Gehalten von Porphyrinen und eine Regulation der ALA-Synthese festgestellt. Die Folgen der Langzeitinduktion und die damit einhergehenden Störungen in der Funktion der Plastiden sollten mit der Expression von repräsentativen Genen korreliert werden. Dafür wurden zum einen die Transkriptmengen der jeweiligen Zielgene (Abbildung 24) der vier RNAi-Linien, zum anderen Transkriptmengen von Referenzgenen für retrograde Signale, sogenannte PhANGs (Abbildung 25), Markergene für reaktive Sauerstoffspezies (Abbildung 26) sowie regulatorisch relevante Gene der TPBS (Abbildung 26) in der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j untersucht.

3.4.5.1 Transkriptanalysen von AtCHLH, AtCHLD, AtCHLM und AtCHL27 in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion

Zur Untersuchung der Geninaktivierung während einer Langzeitinduktion wurden die Transkriptmengen von AtCHLH, AtCHLD, AtCHLM und AtCHL27 in den vier RNAi-Linien vor der Behandlung mit DM sowie ein, zwei und vier Tage nach der Behandlung bestimmt. Es sollte geprüft werden, ob unter den gewählten experimentellen Bedingungen einer dauerhaften Applikation von DM über das MS-Medium zu konstant niedrigen mRNA-Gehalten bei den Zielgenen führt und wie sich diese Transkriptmengen in den jeweils anderen Linien verhalten.

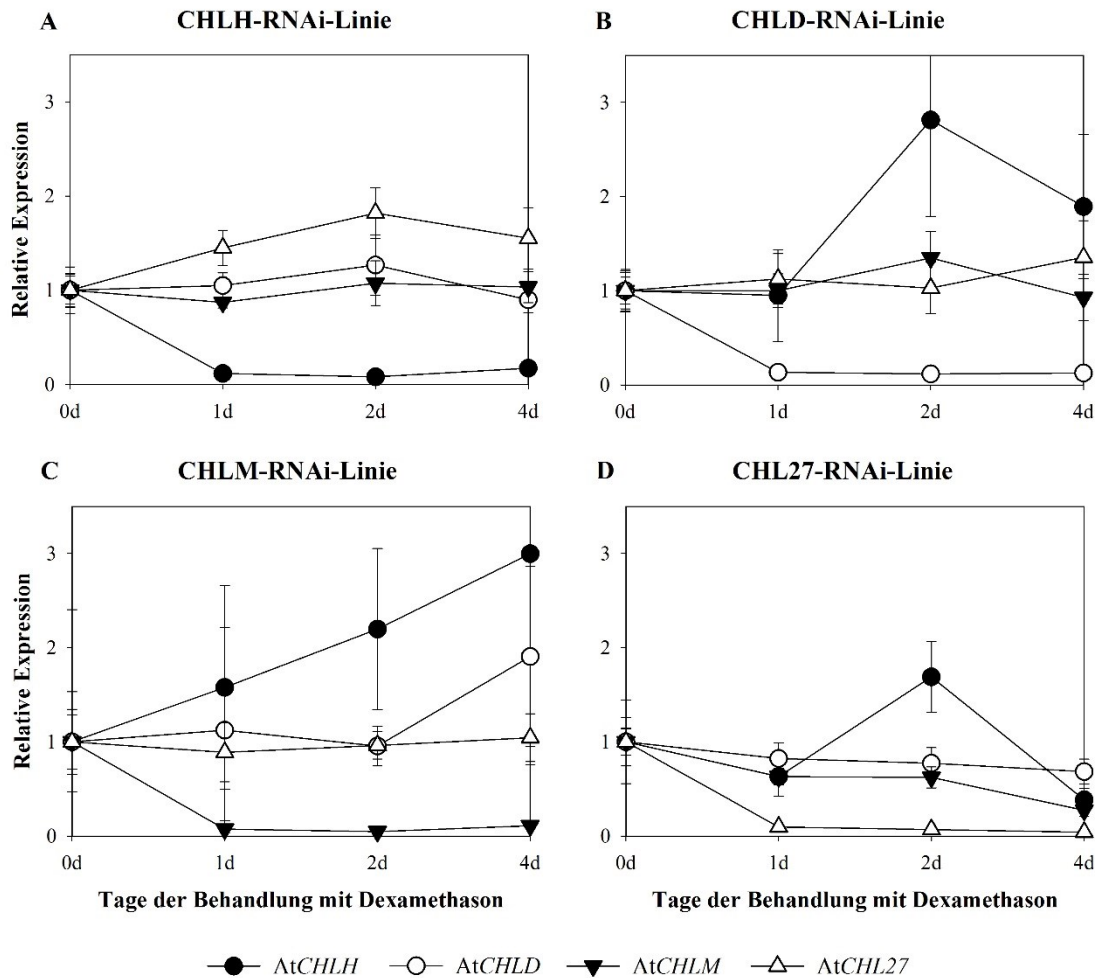


Abbildung 23: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason.

Es wurden Keimlinge der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Angegeben sind die Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten der relativen Expressionen ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) im Vergleich zu der jeweils unbehandelten RNAi-Linie und zur Expression des Referenzgens *AtACT2*.

Die jeweiligen Zielgene der induzierten Geninaktivierung wiesen in den entsprechenden RNAi-Linien stark reduzierte Transkriptgehalte über den gesamten Zeitraum der Behandlung mit DM auf (Abbildung 23 A-D). Die Transkriptmenge von *AtCHL27* war in der CHLH-RNAi-Linie #8l im Vergleich zu der Kontrolle leicht erhöht (Abbildung 23 A). Die mRNA-Gehalte von *AtCHLD* und *AtCHLM* sind in der CHLH-RNAi-Linie #8l über den gesamten Behandlungszeitraum mit denen der unbehandelten Keimlinge vergleichbar (Abbildung 23 A). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei den Transkriptanalysen der CHLD-RNAi-Linie #10h. Die mRNA-Gehalte von *AtCHLM* und *AtCHL27* waren im Wesentlichen

unverändert, wobei die Transkriptmengen von *AtCHLH* nach zwei und vier Tagen Behandlung mit DM leicht erhöht waren (Abbildung 23 B). Für die CHLM-RNAi-Linie #5 wurde während der Langzeitinduktion eine kontinuierliche Erhöhung der mRNA-Gehalte von *AtCHLH* auf das Dreifache im Vergleich zu den Kontrollpflanzen beobachtet (Abbildung 23 C). Die Transkriptmengen von *AtCHLD* und *AtCHL27* waren dabei weitestgehend unverändert (Abbildung 23 C). In der CHL27-RNAi-Linie #21j gab es während der Langzeitinduktion die Tendenz reduzierter Transkriptgehalte von *AtCHLH*, *AtCHLD* und *AtCHLM* (Abbildung 23 D).

3.4.5.2 *Reduktion der Genexpression von PhANGs in der CHL27-RNAi-Linie nach Langzeitinduktion*

Die Transkriptomanalysen der RNAi-Linien ergaben, dass 24 h nach induzierter Reprimierung der Expression von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27* keine Veränderungen von mRNA-Gehalten von PhANGs zu beobachten waren. Dieser Befund sollte bestätigt und der Einfluss einer Langzeitinduktion auf die Expression ausgewählter PhANGs überprüft werden. In der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h und der CHLM-RNAi-Linie #5 waren die mRNA-Gehalte von *AtRBCS*, *AtLHCBI.2* und *AtFC* über einen Behandlungszeitraum mit DM von vier Tagen teilweise leicht erhöht, wobei nie eine Verdopplung der Transkriptmengen im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen erreicht wurde (Abbildung 24 A-C). Dahingegen zeigte die CHL27-RNAi-Linie #21j nach ein und zwei Tagen Behandlung mit DM eine leichte Erhöhung der mRNA-Gehalte von *AtLHCBI.2*, wobei die Transkriptmengen der drei untersuchten PhANGs nach 4 Tagen Reprimierung von *AtCHL27* stark reduziert waren (Abbildung 24 D).

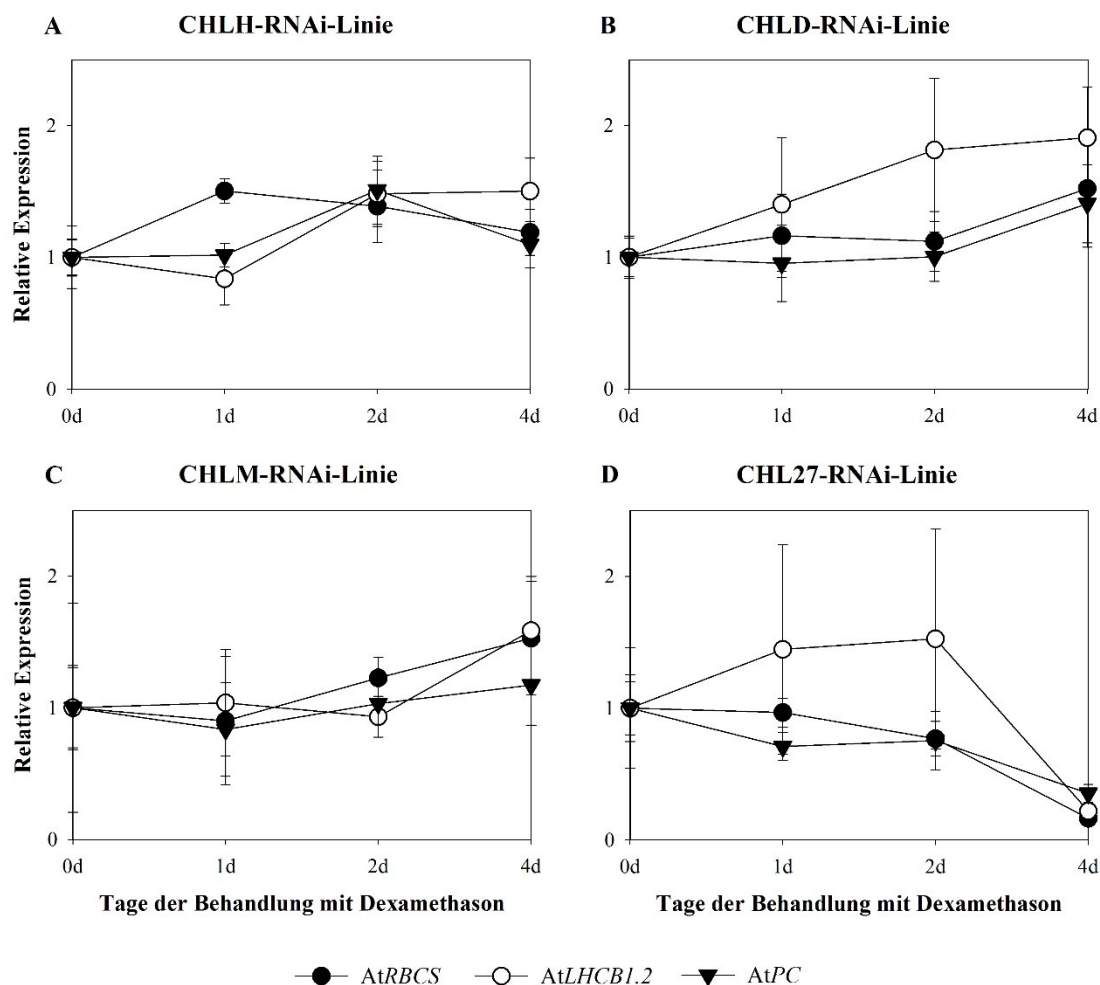


Abbildung 24: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von PhANGs in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason.

Es wurden Keimlinge der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Angegeben sind die Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten der relativen Expressionen ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) im Vergleich zu der jeweils unbehandelten RNAi-Linie und zur Expression des Referenzgens *AtACT2*.

3.4.5.3 Erhöhung der Expression von Markergenen für reaktive Sauerstoffspezies in der CHL27-RNAi-Linie nach Langzeitinduktion

Die Rolle von akkumulierenden ROS als Folge der reduzierten Enzymaktivitäten im Mg-Zweig der TPBS in den vier RNAi-Linien sollte anhand der Transkriptmengen von Markergenen für verstärktes Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies untersucht werden. Die ausgewählten ROS-Markergene werden mit unterschiedlichen ROS im Zusammenhang mit intrazellulärer Signalgebung korreliert. Das Gen *AtBAP1* kodiert für ein Protein, das im Zusammenhang mit der Antwort auf Singulett-Sauerstoff beschrieben wird (op den Camp *et*

al., 2003). Das Gen *AtZAT12* wird wiederum als Markergen für Wasserstoffperoxid eingesetzt (Rizhsky *et al.*, 2004). Die Fe-Superoxide Dismutase (Pulido *et al.*, 2010) und die Glutathion Peroxidase 7 (Mullineaux *et al.*, 2000) sind beide im Plastiden lokalisiert und spielen eine Rolle in der ROS-vermittelten Signalgebung.

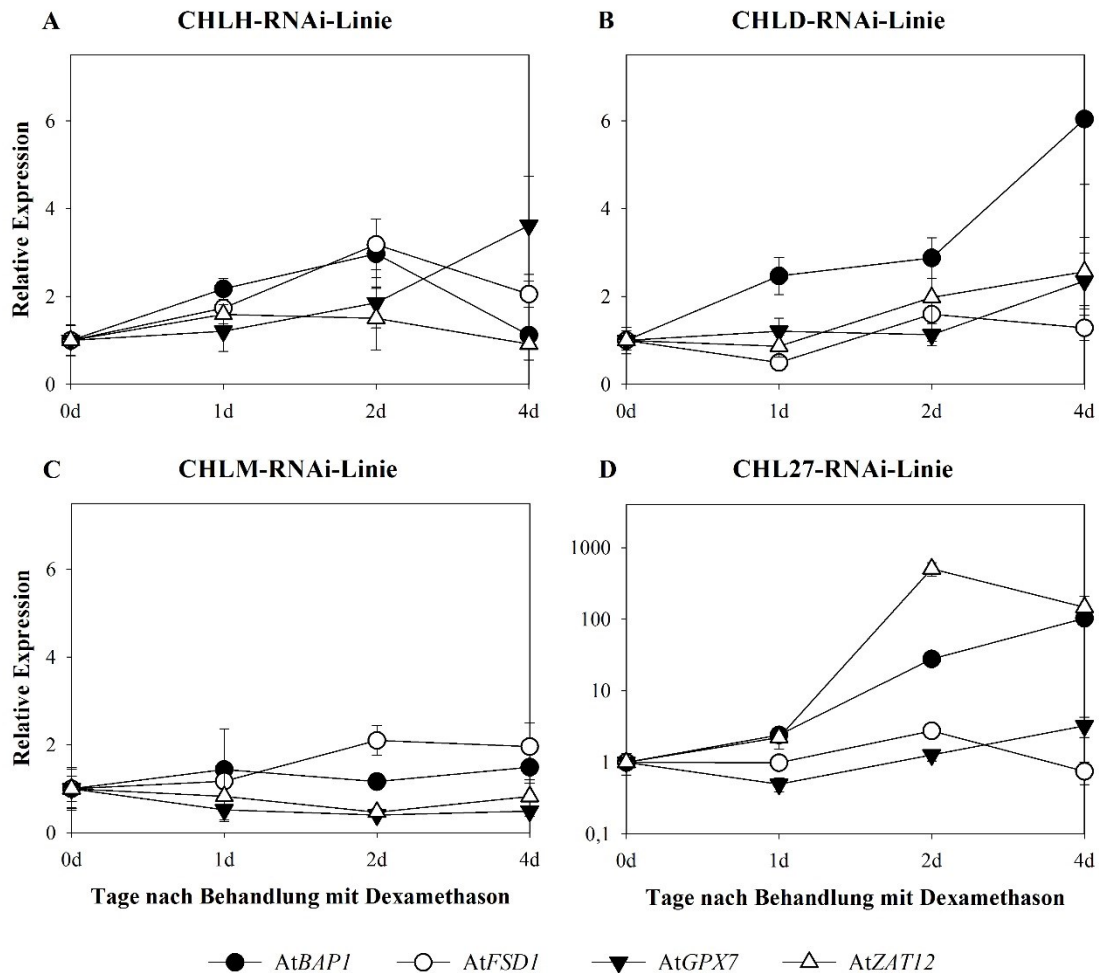


Abbildung 25: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von ROS-Markergenen in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason.

Es wurden Keimlinge der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Angegeben sind die Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten der relativen Expressionen ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) im Vergleich zu der jeweils unbehandelten RNAi-Linie und zur Expression des Referenzgens *AtACT2*.

Der mRNA-Gehalt von *AtBAP1* war in der CHL27-RNAi-Linie #21j am stärksten erhöht und erreichte nach viertägiger Reprimierung von *AtCHL27* einen Wert von fast 100 für die relative Expression im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen (Abbildung 25 D).

Dieser Anstieg der Expression korrelierte mit dem nekrotischen Phänotyp. Dahingegen war in der CHLH-RNAi-Linie #8l und der CHLD-RNAi-Linie #10h während der Langzeitinduktion nur eine leichte Erhöhung der Expression von *AtBAP1* zu verzeichnen (Abbildung 25 A/B). In der CHLM-RNAi-Linie #5 war der mRNA-Gehalt von *AtBAP1* während der gesamten Langzeitinduktion weitestgehend unverändert im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 25 C). Das gilt auch für die Transkriptgehalte von *AtFSD1*, *AtGPX7* und *AtZAT12* (Abbildung 25). In der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h und CHL27-RNAi-Linie 21j war während der Langzeitinduktion eine Erhöhung der Expression von *AtFSD1* und *AtGPX7* zu beobachten, die eine um das Vierfach-erhöhte relative Expression allerdings nicht überschritten hat (Abbildung 25). Der mRNA-Gehalt von *AtZat12* war in der CHLH- und CHLD-RNAi-Linie nicht wesentlich erhöht, wohingegen die Expression in der CHL27-RNAi-Linie #21j um mehr als das Hundertfache erhöht war (Abbildung 25 D).

Die Akkumulation der Porphyrine MgP und MgPME als Folge der verminderten Aktivität der Zyklase nach Induktion der Reprimierung von *AtCHL27* in der CHL27-RNAi-Linie #21j korrelierte mit der starken Erhöhung der Expression der beiden ROS-Markergenen *AtBAP1* und *AtZAT12* (Abbildung 25). Die CHLH-, CHLD- und CHLM-RNAi-Linie zeigten phänotypisch keine Nekrosen nach der Behandlung mit DM, was mit der nur sehr leichten Erhöhung der Expression der ROS-Markergene *AtBAP1* und *AtZAT12* korrelierte.

3.4.5.4 *Starke Erhöhung der Expression der Ferrochelatase 1 in der CHL27-RNAi-Linie nach Langzeitinduktion*

Inwieweit sich die Deregulation der TPBS im Mg-Zweig auf andere Bereiche des Stoffwechselweges auswirkt, wurde anhand der Transkriptmengen von *AtHEMA1*, *AtGUN4*, *AtPORB* und *AtFCI* untersucht. Das Gen *AtHEMA1* kodiert für die GluTR die an der Bildung von ALA zu Beginn der TPBS beteiligt ist. *AtGUN4* kodiert für einen Regulator der Mg-Chelatase und ist somit an der Verteilung von Proto IX auf den Mg-Zweig und den Fe-Zweig beteiligt. Die Aktivität der POR kodiert durch *AtPORB* spielt am Ende des Chlorophyllbiosyntheseweges eine wesentliche Rolle bei der Regulation der TPBS. Das Gen *AtFCI* kodiert für die Ferrochelatase 1 deren Aktivität Einfluss auf den *steady state*-Gehalt des Signalmoleküls Häm hat.

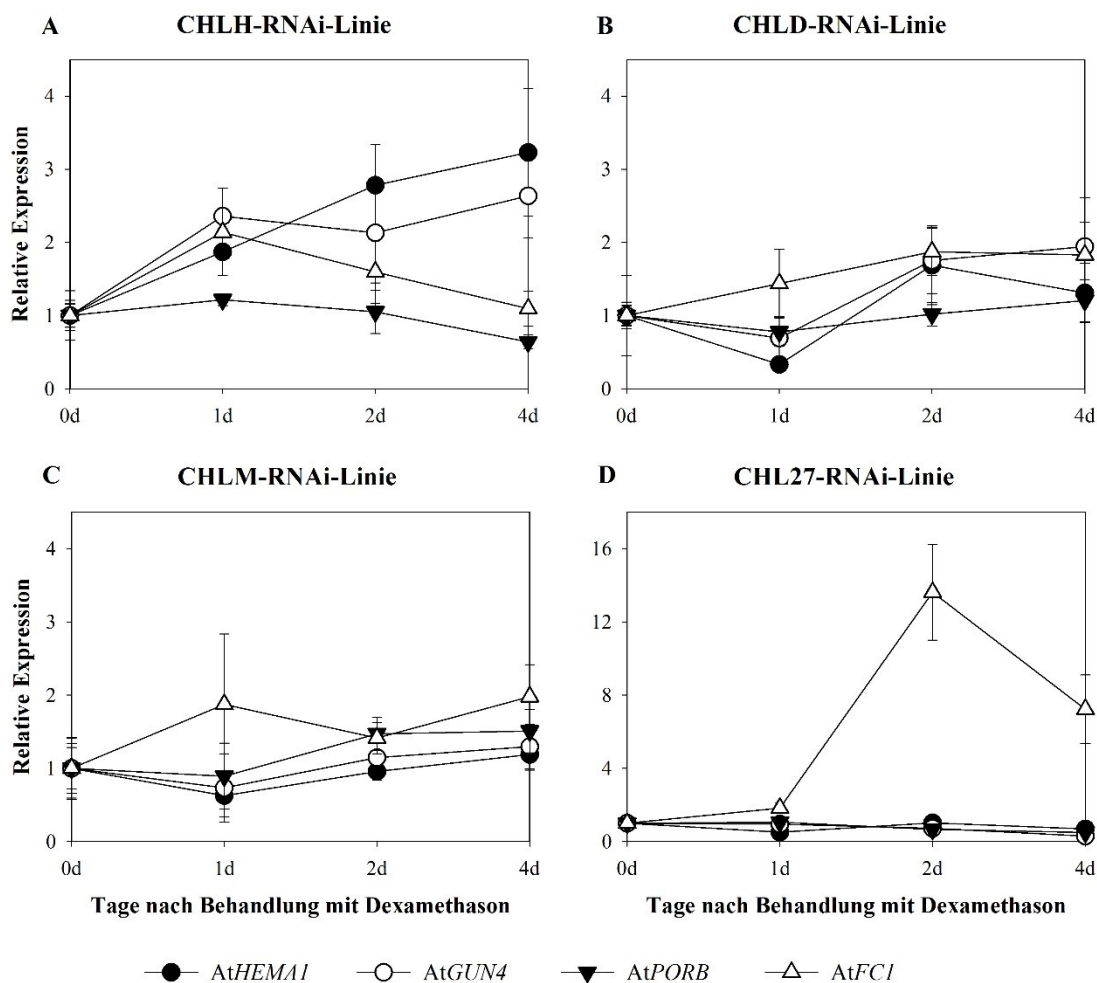


Abbildung 26: Quantitative RT-PCR Analysen der mRNA-Gehalte von TPBS-Genen in den RNAi-Linien während der Langzeitinduktion mit Dexamethason.

Es wurden Keimlinge der CHLH-RNAi-Linie #8l, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j zeitlich versetzt auf MS-Platten mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ DM transferiert. Untersucht wurden 14 Tage alte Keimlinge, die 1, 2 oder 4 Tage mit DM behandelt wurden sowie unbehandelte Keimlinge. Angegeben sind die Mittelwerte (+ S.D.) aus vier biologischen Replikaten der relativen Expressionen ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) im Vergleich zu der jeweils unbehandelten RNAi-Linie und zur Expression des Referenzgens *AtACT2*.

In den Keimlingen der CHLH-RNAi-Linie #8l wurde nach vier Tagen DM-Behandlung eine 3 fache Erhöhung der mRNA-Gehalte von *AtGUN4* und *AtHEMA1* beobachtet (Abbildung 26 A), wobei die Transkriptmengen von *AtFCI* und *AtPORB* unverändert blieben. In den Keimlingen der CHLD-RNAi-Linie #10h und der CHLM-RNAi-Linie #5 war nach vier Tagen Langzeitinduktion die Expression von *AtGUN4*, *AtHEMA1*, *AtFCI* und *AtPORB* nur leicht um nicht mehr das 2-fache im Vergleich zu den unbehandelten Keimlingen erhöht (Abbildung 26 B/C). Während die mRNA-Gehalte von *AtGUN4*, *AtHEMA1* und *AtPORB* in den Keimlingen der CHL27-RNAi-Linie #21j keine Veränderungen während der

Langzeitinduktion im Vergleich zur Kontrolle zeigten, war die Expression von *AtFCI* nach zwei und vier Tagen DM-Behandlung um mehr als das 7-fache erhöht (Abbildung 26 D).

Am stärksten war die Expression der untersuchten Gene nach einer Dauerbehandlung mit DM in der *CHL27*-RNAi-Linie 21j im Vergleich zur Kontrolle verändert. Nach vier Tagen Geninaktivierung von *AtCHL27* (Abbildung 23) waren die Transkriptmengen der untersuchten PhANGs reduziert (Abbildung 24 D) während eine starke Induktion der Expression von Markergenen für ROS beobachtet wurde (Abbildung 25 D) und die mRNA-Gehalte von *AtFCI* erhöht waren (Abbildung 26 D). In den anderen RNAi-Linien wurden nur leichte Veränderungen der Expression um nicht mehr als das 4-fache beobachtet.

4 Diskussion

Die Synthese von Tetrapyrrolen (TP) in Pflanzen unterliegt einer strikten Kontrolle, die vom jeweiligen Entwicklungsstand und wechselnden Umweltbedingungen abhängig ist. Dabei muss die Expression von Plastiden- und Kerngenen koordiniert werden und eine Abstimmung mit anderen plastidären Stoffwechselwegen, wie beispielsweise der Tetrapyrrolbiosynthese (TPBS), erfolgen. Nach dem Konzept der *operational control* (Pogson, 2008) gehen zur Koordination dieser Prozesse, als Antwort auf biotische und abiotische Reize, Signale von den Chloroplasten aus, wodurch die Expression von Kerngenen reguliert wird. Neben einer Vielzahl von plastidenlokalisierten Metaboliten und regulatorischen Mechanismen werden Mg-Porphyrine als retrograde Signale diskutiert, welche zur Kontrolle der *nuclear gene expression* (NGE) beitragen (Gray, 2003; Rodermeil & Park, 2003; Strand *et al.*, 2003; von Gromoff *et al.*, 2006; Ankele *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Metabolite plastidärer Stoffwechselwege können dabei als retrograde Signale abhängig von der Art des Reizes, der Lokalisierung in der Zelle oder dem Gewebe sowie der Konzentration unterschiedliche Funktionen haben und entsprechend verschiedene Antworten auslösen (Chan *et al.*, 2015). Inzwischen ist eine Vielzahl von Prozessen bekannt, die an der retrograden Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern beteiligt sind. Dazu gehören die Assemblierung der Photosysteme (Koussevitzky *et al.*, 2007; Waters *et al.*, 2009; Woodson *et al.*, 2011), die ROS-Bildung an den Photosystemen (Lee *et al.*, 2007; Ramel *et al.*, 2012), der Redoxstatus des Plastochinon-Pool (Estavillo *et al.*, 2011) und der Plastiden (Kindgren *et al.*, 2012a; Xiao *et al.*, 2012) sowie Phytohormon-vermittelte Signalwege (Rodriguez *et al.*, 2010). Dennoch ist wenig über die genauen Mechanismen und Komponenten dieser Signalwege bekannt. Diese Arbeit soll zum Verständnis über die Rolle von Mg-Porphyrinen wie MgP und MgPME in retrograden Signalnetzwerken beitragen.

Die Untersuchung von *knock-out*- oder *knock-down*-Mutanten wird in der Wissenschaft routinemäßig bei der Charakterisierung von Enzymen vorgenommen. Diese konstitutiven Mutanten können dabei in ihrer Entwicklung und der Funktionalität ihrer Organe stark beeinträchtigt sein. Werden Enzyme nur durch ein einziges Gen kodiert kann der *knock-out* auch zur Letalität der Mutation führen. Die Mutation in dem Gen *AtCHLM* führt beispielsweise zu einem Albino-Phänotyp, der sich in kleinen chlorotischen Keimlingen darstellt, da die Methyltransferase essentiell für die Chlorophyllbiosynthese ist (Pontier *et*

al., 2007). Zur Untersuchung von Mechanismen intrazellulärer Kommunikation sind diese experimentellen Voraussetzungen ungeeignet. Pleiotrope Effekte können zu Überlagerungen in den Signalnetzwerken führen und dadurch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die primären Signalmoleküle und spezifischen Signalwege zulassen.

Für ein besseres Verständnis der TP-vermittelten Signalgebung wurden Studien durchgeführt, die den direkten und unmittelbaren Zusammenhang zwischen einer veränderten TPBS und der NGE aufzeigen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der physiologische Zustand der transgenen Pflanzen zum Zeitpunkt der Analysen mit dem der Kontrollpflanzen vergleichbar ist und nur physiologische Unterschiede, bedingt durch die spezifische Inaktivierung der Mg-Chelatase, Methyltransferase und Zyklase, zu beobachten sind (Kapitel 3.2.6).

Eine geeignete Methode zur Reduktion der Expression eines spezifischen Zielgens ist die posttranskriptionelle Geninaktivierung (Watson *et al.*, 2005). Die Virus-induzierte Geninaktivierung ist eine schnelle Methode, bei der auf die Generierung von transgenen Pflanzen verzichtet werden kann (Ruiz *et al.*, 1998). Für *Arabidopsis* ist diese Technik allerdings noch nicht ausreichend etabliert und scheint aufgrund unzureichender Effizienz der Geninaktivierung, die sich teilweise nur auf bestimmte Gewebe begrenzt, als ungeeignet (Avesani *et al.*, 2007). Für eine genaue und zeitlich kontrollierbare Geninaktivierung wurde ein chemisch induzierbares RNAi-System ausgewählt (Wielopolska *et al.*, 2005).

4.1 Induzierbare RNAi-Linien als Voraussetzungen zur Untersuchung von primären Signalen aus der TPBS

Die Hinweise auf TP-vermittelte Änderungen der NGE beruhen im Wesentlichen auf Experimenten in denen neben erhöhten Gehalten an MgP auch andere physiologische Vorgänge, bedingt durch NF-Behandlung oder Mutationen, beeinträchtigt waren. (Strand *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011). Pflanzen litten nach der Behandlung mit NF, einem nicht-kompetitiven Inhibitor der Carotenoid-Biosynthese, unter der Photooxidation der Thylakoidmembranen und einer beeinträchtigten Chloroplasten-Biogenese (Strand *et al.*, 2003). Mutanten der TPBS wie beispielsweise *gun4* und *gun5* wiesen verminderte Chlorophyllgehalte auf, wodurch die Assemblierung der Photosysteme beeinträchtigt war (Mochizuki *et al.*, 2001; Larkin *et al.*, 2003).

Dadurch wurden bei diesen Untersuchungen zwangsläufig Pflanzen mit nicht funktionstüchtigen Chloroplasten und Pflanzen mit intakten Chloroplasten miteinander verglichen. Anders als in diesen experimentellen Ansätzen sollten die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzen möglichst wenig pleiotrope Effekte zeigen, um den Einfluss einer Redox- oder ROS-vermittelten Anpassung der NGE zu minimieren. Ein unveränderter Chlorophyllgehalt ist dabei ausschlaggebend, da eine direkte Korrelation mit der Funktionalität der Photosysteme besteht, die wiederum Einfluß auf den Redox-Status und die Bildung von ROS hat. Dementsprechend sollte ein experimenteller Ansatz gefunden werden, bei dem *Arabidopsis*-Keimlinge mit intakten Chloroplasten miteinander verglichen werden. Dabei sollten Keimlinge mit höheren und niedrigeren MgP-Gehalten im Vergleich zu den Kontrollkeimlingen Aufschluß über die Rolle der Mg-Porphyrine bei der Regulation der NGE geben.

Für die Untersuchung von primären, retrograden Signalen aus der TPBS wurden in der vorliegenden Arbeit transgene Pflanzen mit dem pOpOff2-Vektor (Wielopolska *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006) zur spezifischen Geninaktivierung der Zielgene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* generiert und charakterisiert. Die transgenen Pflanzen der RNAi-Linien exprimierten konstitutiv einen chimären Transkriptionsfaktor, der durch DM aktiviert wurde, was zur Expression des sequensspezifischen RNAi-Konstruktes führte. Als Folge bildete sich doppelsträngige RNA, die von der Endonuklease DICER in *short interfering* RNAs (siRNAs) mit einer Größe von 21-23 Nukleotiden zerlegt wurde. Der RNA-induced silencing complex (RISC) enthielt mit ARGONAUT eine Endonuklease, die einen zielgerichteten Abbau der komplementären mRNA-Moleküle bewirkte (Small, 2007). So wurde innerhalb von 6 h der Transkriptgehalt des Zielgens vermindert, wobei die Reduktion des mRNA-Gehaltes des Zielgens bis zu 12 Tage ohne nochmalige DM-Behandlung anhielt (Wielopolska *et al.*, 2005).

Dieses System erlaubt nach DM-Behandlung eine schnelle Induktion der Geninaktivierung der Zielgene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* sowie *AtCHL27*, was bereits nach 6 h zur Reduktionen des Transkriptgehaltes um das 5-fache (Abbildung 4) und nach 24 h um das 10-fache führte (Abbildung 7). Die schnelle Induktion der Geninaktivierung führte schon nach 24 h zu verminderten Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der Zyklase (Abbildung 8). Daraus resultierten teils starke Veränderungen der *steady state*-Gehalte von MgP, MgPME und Pchlid (Abbildung 9 B-D). Der ratenlimitierende Schritt der

TPBS, die ALA-Synthese zeigte in den RNAi-Linien eine Reduktion um bis das 5-fache nach Kurzzeitinduktion (Abbildung 12). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet der Mechanismus der *feedback* Regulation (Kapitel 4.5) innerhalb der TPBS. Die Chlorophyllgehalte waren zu diesem Zeitpunkt noch unverändert (Abbildung 10) und die Keimlinge der RNAi-Linien unterschieden sich phänotypisch nicht von denen der Kontrolle (Abbildung 11). Entsprechend ist es in dieser frühen Phase der Kurzzeitinduktion sehr wahrscheinlich, dass weder der Photosyntheseapparat noch andere physiologische Prozesse beeinträchtigt sind und die Keimlinge voll funktionsfähige Chloroplasten und Organe besitzen. Demnach sind die Voraussetzungen zur Untersuchung der primären TP-vermittelten Signalwege zur Regulation der NGE gegeben.

Bezogen auf die Porphyringehalte konnten für Transkriptom-Analysen drei verschiedene Zustände mit der Kontrolle verglichen werden. Die Keimlinge der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie zeigten im Vergleich unterschiedliche Konzentrationen an Proto IX, MgP, MgPME und Pchlid (Abbildung 9). Als Grundlage für eine Aussage über den Einfluss von Mg-Porphyrinen auf die NGE standen entsprechend verschiedene Zustände der *Arabidopsis*-Keimlinge zur Verfügung, in denen die TP-Gehalte verringert oder erhöht waren. Mit diesem Ansatz kann unterschieden werden, ob erhöhte Mengen an MgP und MgPME oder ob ein Fehlen dieser potentiellen Signalmoleküle zu Veränderungen der NGE führen.

4.2 Änderung der Expression von Kerngenen nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von AtCHLH, AtCHLM und AtCHL27

Die Ergebnisse der *microarray*-Analysen zeigten nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von AtCHLH, AtCHLM und AtCHL27 eine Veränderung der Expression in 206, 188 und 206 Kerngenen der drei untersuchten RNAi-Linien (Tabelle 8 - 10). In allen drei RNAi-Linien wiesen ca. zwei Drittel der Gene erhöhte und ein Drittel verringerte Transkriptgehalte auf (Abbildung 14). Interessanterweise ist die Deregulation dieser Gene im Vergleich unter den RNAi-Linien auffällig einheitlich. Die verschiedenen Gehalte an MgP und MgPME in den drei RNAi-Linien (Abbildung 9 B, C) führten entsprechend zu einer ähnlichen Veränderung der NGE. Bislang konnten nur erhöhte Konzentration von MgP mit Veränderungen der Expression von Kerngenen wie *LHCB* und *RBCS* korreliert werden. So zeigten mehr als 300 Kerngene im Wildtyp nach der NF-Behandlung eine Deregulation der Expression (Strand *et al.*, 2003).

Derzeit gibt es keine Publikationen, die in einem vergleichbaren Ansatz, in *Arabidopsis* unter Nutzung des pOpOff2-Vektor-Systems *microarray*-Daten zeigten. Wenn das hier verwendete induzierbare RNAi-System eingesetzt wurde, sollten pleiotrope Effekte bei der Analyse von Mutanten oder konstitutiv exprimierten RNAi-Systemen minimiert werden (Lee & Kim, 2013). Die in dieser Arbeit verwendete LUC-RNAi-Linie diente als Kontrolle für die *microarray*-Analysen. Nach DM-Behandlung wurde in der LUC-RNAi-Linie ein Transgen mit der Sequenz einer *firefly*-Luciferase über das induzierbare System exprimiert, so dass es zu keiner Geninaktivierung eines *Arabidopsis*-Gens kam. Diese LUC-RNAi-Linie ist im Vergleich zum Wildtyp phänotypisch unauffällig (Abbildung 18). Der Chlorophyllgehalt, die Länge der Kotyledonen, der Wurzeln und des Hypokotyls sind ebenfalls vergleichbar mit dem Wildtyp (Huang *et al.*, 2011). Ergänzend zu diesen Parametern konnte gezeigt werden, dass die Porphyrin-Gehalte ebenfalls nicht von denen des Wildtyps abwichen (Abbildung 19). Dementsprechend zeigten die Keimlinge der LUC-RNAi-Linie mit und ohne DM-Behandlung keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp. Alle Komponenten des RNAi-Systems werden aber wie in der CHLH-, CHLD-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie exprimiert.

Die Gegenüberstellung der Transkriptomdaten nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27* mit denen der LUC-RNAi-Linie zeigte eine große gemeinsame Schnittmenge. Insgesamt 99 Gene waren sowohl in der LUC-RNAi-Linie als auch in den anderen drei RNAi-Linien dereguliert (Abbildung 15). Aus dem Vergleich der *microarray*-Daten der vier RNAi-Linien geht hervor, dass auch hier die Expression der 99 Gene einheitlich hoch oder herunter reguliert war (Tabelle 8 - 10). Aus den *microarray*-Analysen ergaben sich weitere Schnittmengen von Genen, die in mindestens einer der CHLH-, CHLM- sowie CHL27-RNAi-Linie und der LUC-RNAi-Linie dereguliert waren (Abbildung 15). Die Mehrheit dieser Gene aus den Schnittmengen mit der LUC-RNAi-Linie zeigten ebenfalls dieses Phänomen (Abbildung 29). Um zu verifizieren, dass kein experimenteller Fehler bei der Generierung der *microarray*-Daten vorlag, wurde in einem unabhängigen Experiment mittels qRT-PCR die Deregulation von 14 Genen nach 24 h Geninaktivierung in den RNAi-Linien untersucht (Tabelle 5). Die Ergebnisse dieser Stichproben konnten zu 100 % die Deregulation dieser Gene in den RNAi-Linien bestätigen. Darüber hinaus konnte auch für die CHLD-RNAi-Linie #10h, für die keine *microarray*-Daten nach 24 h Geninaktivierung vorlagen, die gleiche Deregulation der 14 untersuchten

Gene nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass es sich um einen sehr robusten Datensatz für die *microarray*-Analyse handelt und die Deregulation dieser Gene einheitliche Ursachen zu haben scheint.

4.3 Mögliche Ursachen für die unspezifische Deregulation der Expression von Genen in den induzierten RNAi-Linien

Aus der Diskussion in den bisher veröffentlichten Arbeiten um die Vor- und Nachteile des eingesetzten induzierbaren RNAi-Systems ging kein Hinweis hervor, dass das Transkriptom der transgenen Pflanzen möglicherweise einer unspezifischen Veränderung unterlag, die auf das RNAi-System zurück zu führen war. Vielmehr wurde auf die Möglichkeit mangelnder Effizienz und Stabilität eines solchen experimentellen Ansatzes hingewiesen, die beispielsweise durch ein *silencing* des Transgens bedingt sein können (Small, 2007). Erst mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde auf unspezifische Veränderungen des Transkriptoms in den RNAi-Linien hingewiesen (Schlicke *et al.*, 2014).

Der Einfluss des gewählten RNAi-Systems selbst auf die NGE wurde durch verschiedene Kontrollen beschrieben. Die Expression der RNAi-Zielgene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* wurde in nicht-induzierten Keimlingen der jeweiligen RNAi-Linie gemessen und mit dem Wildtyp verglichen (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss des durch das RNAi-System konstitutiv exprimierten, chimären Transkriptionsfaktors auf die Expression der Zielgene konnte dadurch jedoch nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde der Effekt des DM auf die Expression der Zielgene durch Applikation von DM auf den Wildtyp überprüft. Auch hier war keine Veränderung der Expression der RNAi-Zielgene feststellbar. Das zeigt, dass kein Einfluss auf die Expression der RNAi-Zielgene von dem in den RNAi-Linien konstitutiv exprimierten, chimären Transkriptionsfaktor ausgeht. Zudem wurde anhand der Experimente zur Langzeitinduktion gezeigt, dass es keine ungewollte Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* ohne DM-Behandlung gab, da diese bei den Keimlingen zu Chlorosen und Nekrosen führen würde (Abbildung 27). Eine mögliche Ursache für die unspezifischen Änderungen der NGE könnte die Bildung von siRNA als Folge der Induktion durch DM sein. Dabei könnten ähnliche Mechanismen wie bei der zellulären Reaktion auf Pathogene eine Rolle spielen. Unabhängig von der Sequenz besteht die Möglichkeit, dass diese siRNA von der Pflanzenzelle wahrgenommen werden kann und eine Antwort auslöst. In wie weit siRNA eine unspezifische Veränderung der NGE zur Folge hat, wurde in der Literatur noch nicht diskutiert. In einem Experiment wurde mit

einem vergleichbaren β -Estradiol-induzierten RNAi-System die Geninaktivierung des Gens *RETINOBLASTOMA-RELATED* durchgeführt (Borghi *et al.*, 2010). Ein Vergleich der Expressionsdaten zeigte, dass 24 h nach Induktion nur 5 Gene aus der Schnittmenge der deregulierten Gene der CHLH-, CHLM-, CHL27 sowie LUC-RNAi-Linie in gleicher Weise dereguliert waren (Abbildung 16). Dadurch wurde auch die Hypothese in Frage gestellt, dass von siRNA eine potentielle Signalquelle ausgeht. Diese Kontrollexperimente gaben keinen Hinweis auf die Ursache für die Veränderung der NGE in den RNAi-Linien, so dass diese Frage im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden konnte. Es bleiben dennoch Hinweise, dass die Ursache für die unspezifische Änderung der NGE von dem RNAi-System ausgeht. Die Analyse von *microarray*-Daten 6 h nach Induktion der Geninaktivierung von *AtCHLD* zeigte, dass 14 Gene aus der Schnittmenge der 99 gemeinsam deregulierten Gene schon 6 h nach DM-Behandlung in den Keimlingen der CHLD-RNAi-Linie dereguliert waren (Tabelle 5). Die schnelle Veränderung der NGE nach 6 h DM-Behandlung zeigte, dass eine spezifische Deregulation durch reduzierte Transkriptmengen von *AtCHLD* unwahrscheinlich ist, da die Keimlinge der CHLD-RNAi-Linie #10h zu diesem Zeitpunkt noch keine Veränderung der Aktivität der Mg-Chelatase zeigten (Daten nicht gezeigt).

4.4 Die Rolle von TPBS-vermittelten Signalen zur Regulation der Expression von Kerngenen

Die verminderte Expression von *RBCS* und *LHCBI* wurde bereits Ende der 80er Jahre mit einem Mangel an Chlorophyll in Pflanzengewebe korreliert (Giuliano & Scolnik, 1988). Diese beiden Gene wurden damals der Familie der *photosynthesis-associated nuclear genes* (PhANG) zugeordnet. Die ersten Untersuchungen von *gun*-Mutanten stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Funktionalität des Chloroplasten und der Expression der beiden PhANGs her (Susek *et al.*, 1993). Weitere Experimente mit NF zeigten, dass die Expression von PhANGs negativ durch die Akkumulation von MgP reguliert wird (Mochizuki *et al.*, 2001; Strand *et al.*, 2003). Durch diese Experimente hat sich die Expression von *RBCS* und *LHCBI* zum Marker der TP-vermittelten retrograden Signalgebung entwickelt. Der sogenannte Gun-Phänotyp zeigt sich in einer weniger starken Reduktion der Expression von PhANGs nach der Behandlung mit NF (Mochizuki *et al.*, 2001). Zur Untersuchung des sogenannten Gun-Phänotyps in der *gun6-1D* Mutante wurde die Gruppe der PhANGs mit Genen ergänzt, die einer Regulation während der

Chloroplasten-Biogenese unterliegen (Woodson *et al.*, 2011). So konnte in der *gun6-1D* Mutante der Gun-Phänotyp für die Gene *RBCS*, *LHCBI*, *CAI* (CARBONIC ANHYDRASE 1), *CP12* (CHLOROPLAST PROTEIN 12) und *PC* (PLASTOCYANIN) nachgewiesen werden (Woodson *et al.*, 2011). Dementsprechend sind die PhANGs als Referenzgene für retrograde Signale immer im Kontext mit der Chloroplasten-Biogenese zu sehen, welche in Folge einer NF-Behandlung beeinträchtigt sein kann. Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der RNAi-Linien sollte gezeigt werden, in wie weit die PhANGs als Referenzgene während der *biogenic control* auch Ziele der TP-vermittelten Signalgebung während der *operational control* sind (Kapitel 1.3).

Die *microarray*-Analysen zeigten, dass es Gene gibt, die als Folge veränderter Enzymaktivitäten im Mg-Zweig der TPBS exklusiv nur in einer der RNAi-Linien oder gemeinsam in zwei oder drei der RNAi-Linien dereguliert waren (Abbildung 15). Unter diesen Genen befinden sich keine Vertreter der PhANGs. Diese Referenzgene für TP-vermittelte retrograde Signale zeigten auch in Keimlingen mit intakten Chloroplasten während der *operational control* keine Veränderungen der Expression als Folge stark veränderter *steady state*-Gehalte von MgP und MgPME (Abbildung 9 B, C). Dieser Befund deckt sich mit dem Ergebnis aus NF-Experimenten früherer Arbeiten, bei denen keine Korrelation zwischen dem *steady state*-Gehalt von MgP und der Expression von Kerngenen wie *LHCBI* hergestellt werden konnte (Mochizuki *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2008). Anhand von Messungen mittels Massenspektrometrie wurde gezeigt, dass nach NF-Behandlung weder in etiolierten Keimlingen noch nach einer 24-stündigen Lichtphase veränderte Gehalte Proto IX, MgP oder MgPME im Vergleich zur Kontrolle vorlagen und trotzdem Veränderungen der NGE zu beobachten waren (Moulin *et al.*, 2008). Die Untersuchungen der Expression von PhANGs in *gun*-Mutanten wurde weitestgehend mit Keimlingen durchgeführt, die für mehrere Tage auf Medium mit oder ohne NF gewachsen sind (Strand *et al.*, 2003; Woodson *et al.*, 2011). In den hier untersuchten CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linien wurden nach Kurzzeitinduktion unter Bedingungen der *operational control* keine veränderten Transkriptenmengen von PhANGs festgestellt. Diese Ergebnisse wurden mit ca. 2 Wochen alten *Arabidopsis*-Keimlingen erzeugt, die auf Erde gewachsen und 3 Tage unter Dauerlicht akklimatisiert waren. Die zuvor erwähnten Experimente mit NF wurden mit ca. 1 Woche alten auf MS-Medium mit Zucker gewachsenen Keimlingen durchgeführt. Da die in dieser Arbeit gewählten experimentellen Voraussetzungen zu den Experimenten mit

gun-Mutanten doch sehr stark voneinander abweichen, ist die Gruppe der PhANGs als Marker für TP-vermittelte retrograde Signalgebung, für die hier durchgeführten Experimente der Kurzzeitinduktion, in Frage zu stellen.

Dennoch wurden die 34 gemeinsam deregulierten Genen der CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie, die nicht in der LUC-RNAi-Linie dereguliert sind, auf einen möglichen Gun-Phänotyp untersucht. Dazu wurden Expression-Daten aus früheren Experimenten nach NF-Behandlung analysiert. Mittels der Software Genevestigator dargestellte Expressionsdaten aus Versuchen mit *gun*-Mutanten und NF-Behandlung geben keine Hinweise, dass eines der 34 gemeinsam deregulierten Gene einen Gun-Phänotyp zeigt (Abbildung 17). Auch war für diese Gene keine Veränderung der Transkriptgehalte in der *gun5*- oder *gun1-9*-Mutante zu beobachten. Diese zeigten kein Expressionsmuster was mit denen der PhANGs nach NF-Behandlung korreliert. Demnach scheinen die PhANGs eher für die Untersuchung von TP-vermittelten plastidären Signalen während der *biogenic control* geeignet zu sein.

Auch wenn sich nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27* unter den deregulierten Genen keine Vertreter von PhANGs befanden, wurden in dieser Arbeit *in silico* Analysen durchgeführt, um eine Korrelation zwischen den Veränderungen der TPBS und der NGE zu untersuchen. Es wurde nach überrepräsentierten Gruppen von Genen gesucht, um Anhaltspunkte für spezifische Zusammenhänge zu erhalten. Unter den 47 exklusiv deregulierten Genen der CHL27-RNAi-Linie #21j befand sich keine Gruppe die laut GO-Analyse (*Gene Ontology*) überrepräsentiert war. Für die vermeintlich interessanten GO-Kategorien *process* und *function* konnten auch für die exklusiv deregulierten Gene in der CHLM-RNAi-Linie #5 und der CHLH-RNAi-Linie #81 keine überrepräsentierte Gruppe von Genen gefunden werden (Tabelle 6). Lediglich die 34 gemeinsam deregulierten Gene (Tabelle 7), welche nach der Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27* gefunden wurden, zeigten eine Gruppe von überrepräsentierten Genen der GO-Kategorie *defense response*. Allerdings ist auch unter den 99 deregulierten Genen der CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie eine Gruppe in der gleichen Kategorie *defense response* überrepräsentiert. Hinzu kommt, dass viele der 34 Gene den gleichen Trend der Deregulation auch in der LUC-RNAi-Linie zeigten (Tabelle 7). Demnach können keine weiteren Hinweise auf eine bestimmte Zielgruppe von Genen abgeleitet werden, die im Zuge der TP-vermittelten retrograden Signalgebung an einer spezifischen Antwort auf Veränderungen der TPBS beteiligt sind.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, welche Gene als Ziel unter diesen experimentellen Bedingungen in Frage kommen. Die Gene der TPBS gehören zu potentiellen Zielgenen, um das Ungleichgewicht der Metabolitgehalte von MgP und MgPME auszugleichen. Nach Kurzzeitinduktion waren in den RNAi-Linien bis auf die entsprechenden Zielgene keine Gene der TPBS dereguliert. Regulatoren der TPBS wie Komponenten der Redoxkontrolle und Phosphorylierung kommen ebenfalls als mögliche Zielgene in Frage. Die Expression der Gene bekannter Komponenten war nach 24 h Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27* allerdings auch nicht verändert. Geht man davon aus, dass Porphyrine sich wie *second messenger* verhalten und Antworten auf biotische und abiotische Reize vermitteln, kommen alle Gene in Frage, die bei diesen Stressantworten eine Rolle spielen. ROS als *second messenger* spielen bei diesen Antworten immer eine Rolle im Zusammenspiel mit anderen Signalnetzwerken unter Beteiligung von beispielsweise Lichtrezeptoren und Pflanzenhormonen. Da in den RNAi-Linien nach Kurzzeitinduktion lediglich die Gehalte der Mg-Porphyrine verändert und keine Stressantworten auf Reize wie Kälte, Starklicht oder Trockenheit zu erwarten waren, fanden sich auch hier unter den deregulierten Genen keine Gene wieder, deren Genprodukte mit der TPBS oder TPBS-assoziierten Vorgängen korrelieren.

Störungen im Metabolitfluß der TPBS werden als wichtige Faktoren für Stressreaktionen beschrieben (Barajas-Lopez Jde *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass ein Temperaturabfall von 22 °C auf 4 °C eine drastische Reduktion der Gehalte von MgP und MgPME innerhalb von 4 h mit sich führt, was mit verringerten mRNA-Gehalten von *LHCB1.1* und *LHCB2.4* korreliert wurde (Kindgren *et al.*, 2015). Reduzierte Gehalte an MgP und MgPME wurden in der CHLH-RNAi-Linie nach 24 h auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Die Transkripte von *LHCB1.1* und *LHCB2.4* waren jedoch basierend auf den *microarray*-Analysen nach Kurzzeitinduktion nicht reduziert. Demnach scheint bei der Reaktion auf Kälte ein Zusammenspiel von Signalnetzwerken nötig zu sein, um eine Stressantwort auszulösen.

Eine Möglichkeit, um Hinweise über die Funktion der Genprodukte von deregulierten Genen zu erhalten ist die Untersuchung von T-DNA Insertions Linien. Das Gen AT1G19640 (*JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE*) gehört zu den 34 gemeinsam deregulierten Genen, die keine Änderung des mRNA-Gehaltes in der LUC-RNAi-Linie zeigten. Der *knock-out* des Gens führt im Vergleich zum Wildtyp zu keinen phänotypischen

Unterschieden. Das Gleiche gilt, wenn die Pflanzen Kältestress oder Starklicht ausgesetzt waren. Auch der Gehalt an Proto IX, MgP, MgPME und Pchlid sowie der Chlorophyllgehalt unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Diese Analysen zeigten, dass es keine Korrelation zwischen der Funktion des Genproduktes von AT1G19640 und der TPBS sowie einer möglichen Beteiligung an einer Stressantwort und den gewählten Bedingungen gibt.

Alle Erkenntnisse zusammen lassen den Schluß zu, dass es bei dem für diese Arbeit gewählten experimentellen Ansatz keine primären TPBS- bzw. TP-vermittelten Signalewege zur Regulation der NGE während der *operational control* in den untersuchten RNAi-Linien zu geben scheint. Es wurde gezeigt, dass nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27* sowohl die Beeinträchtigung der TPBS durch reduzierte Enzymaktivitäten im Mg-Zweig als auch die Veränderung der Gehalte an Mg-Porphyrinen wie MgP und MgPME keine unmittelbaren primären Quellen bzw. Signalmoleküle von retrograden Signalewegen zur Regulation der NGE waren. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Mg-Porphyrine und Veränderungen der TPBS eine Rolle bei der Vermittlung von Stressantworten spielen. So kann beispielsweise bei Temperaturänderungen eine Stressantwort ausgelöst werden, die auch zu Veränderungen in der TPBS führt, was wiederum als sekundäres Signal weitere Antworten innerhalb eines hierarchisches Signalnetzwerkes vermitteln kann.

Diese Beobachtungen stehen entgegen der Sichtweise, dass Proto IX, Mg-Porphyrine sowie der Mg-Zweig der TPBS an der plastidären retrograden Signalgebung beteiligt sind (Strand *et al.*, 2003; McCormac & Terry, 2004; Kindgren *et al.*, 2012b). Viele dieser Erkenntnisse stammen von Mutanten der TPBS, die teilweise zusätzlich mit Inhibitoren wie NF behandelt wurden (Mochizuki *et al.*, 2001; McCormac & Terry, 2004). Die Entwicklungsphase der untersuchten Keimlinge war in einigen Fällen der *biogenic control* zuzuordnen, wobei auch hier keine klare Differenzierung von TP-vermittelter und ROS-abhängiger Signalgebung möglich ist. In einer Phase der Deetioliierung und der Plastidenbiogenese ergeben sich aufgrund der unterschiedlichen Entwicklungsstadien Schwierigkeiten im experimentellen Ansatz, um eine Vergleichbarkeit von Kontrolle zu Mutante oder NF-Behandlung zu gewährleisten. Das induzierbare RNAi-System ermöglicht die Arbeit mit grünen voll ausgebildeten *Arabidopsis*-Keimlingen mit funktionstüchtigen, photosynthetisch aktiven Chloroplasten, die erst mit der Dauer der DM-Behandlung Beeinträchtigungen zeigten und

in einer frühen Phase der Induktion geeignet waren, um ganz spezifischen Unterschiede im Gehalt an Mg-Porphyrinen mit Veränderungen der NGE zu korrelieren. Ein großer Vorteil bei diesem experimentellen Ansatz ist sicherlich auch die Tatsache, dass hier mit vergleichbaren Pflanzenmaterial gearbeitet wurde und nicht Keimlinge mit intakten und nicht intakten Chloroplasten verglichen worden.

4.5 Die Rolle von Proto IX und ALA als Signalmoleküle

Die nach Kurzzeitinduktion der RNAi-Linien reduzierten Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der Zykase (Abbildung 8) und die damit verbundenen metabolischen Konsequenzen in Form erhöhter oder verminderter Mg-Porphyrin-Gehalte (Abbildung 9), scheinen innerhalb der TPBS posttranslationale Regulationsmechanismen zu aktivieren. So sind trotz unveränderter Proteingehalte der GluTR (Abbildung 13) reduzierte ALA-Synthesekapazitäten beobachtet worden (Abbildung 12), die auf mögliche Veränderungen der Aktivität der GluTR hinweisen.

Für die Regulation der ALA-Synthese werden unterschiedliche Mechanismen beschrieben. Zwei Mechanismen zielen auf die posttranslationale Regulation der GluTR ab (Tanaka *et al.*, 2011). Der Erste beruht auf der Bindung von Häm an die GluTR, was zur Reduktion der Enzymaktivität führte (Pontoppidan & Kannangara, 1994; Vothknecht *et al.*, 1996; Vothknecht *et al.*, 1998). Eine Erhöhung der *steady state*-Gehalte von Häm wurde während der Langzeitinduktion der Reprimierung von *AtCHL27* allerdings nicht beobachtet. Die Differenzierung von freiem und gebundenem Häm (Woodson *et al.*, 2011) lässt dennoch eine mögliche Rolle von Häm als Regulator der ALA-Synthese zu, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht untersucht wurde.

Der zweite regulatorische Mechanismus führte zur FLU-vermittelten Inhibierung der GluTR-Aktivität im Dunkeln. Die *flu*-Mutante zeigt im Dunkeln keine Reduktion der ALA-Synthese, was zur Akkumulation von Pchlid führte (Meskauskiene *et al.*, 2001). Außerdem wurde die Interaktion von FLU mit der von dem Gen *AtHEMA1* kodierten GluTR1 gezeigt (Meskauskiene & Apel, 2002) und die Rolle von FLU auf die GluTR-Aktivität im Licht diskutiert (Goslings *et al.*, 2004). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass ALA-Syntheserate durch Phosphorylierung oder auch Redoxkontrolle der GSAT reguliert wurde (Brzezowski *et al.*, 2015).

Untersuchungen von *Arabidopsis*-Keimlingen der *gun4-1*-Mutante sowie von Gabaculin-behandelten Keimlingen zeigten eine Gruppe von gemeinsam deregulierten Genen (Czarnecki *et al.*, 2012). Gabaculin ist ein Inhibitor der GSAT. Die Behandlung mit Gabaculin führte genau wie in den Keimlingen der *gun4-1*-Mutante zu einer Reduktion der ALA-Synthese. Bei diesem experimentellen Ansatz wurde entsprechend von einer Signalwirkung der verminderten ALA-Synthese auf die NGE ausgegangen. Die CHLH- und CHLM-RNAi-Linie zeigten wie die NtCHLH und NtCHLM antisense-RNA-Linien in Tabak (Papenbrock *et al.*, 2000; Alawady & Grimm, 2005) eine verminderte ALA-Synthesekapazität (Abbildung 22). Auch wenn die Untersuchungen der transgenen Tabak-Linien auf eine regulatorische Rolle der TPBS auf die NGE hinwies, konnten in dieser Arbeit reduzierte ALA-Syntheseraten nach Kurzzeitinduktion nicht mit spezifischen Veränderungen der NGE korreliert werden.

Die reduzierte ALA-Synthese führte nach Langzeitinduktion zu verminderten Chlorophyllgehalten und damit zu Veränderungen der Photosysteme. Eine zeitliche Auflösung dieser Vorgänge verbunden mit globalen Transkriptom-Analysen der RNAi-Linien könnte zu einem weiteren Verständnis der Rolle von ALA als Signalmolekül der Differenzierung retrograder Signalnetzwerke beitragen.

Nach 4 Tagen Langzeitinduktion korreliert die reduzierte ALA-Syntheserate in den Keimlingen der CHL27-RNAi-Linie (Abbildung 22) mit dem reduzierten Transkriptgehalt von AtHEM1 (Abbildung 26 D). Unabhängig davon konnte eine Beeinträchtigung der ALA-Synthese bedingt durch oxidativen Stress während der Deetiolierung von Gurkenkeimlingen gezeigt werden (Aarti *et al.*, 2007). Demnach kommen die in der CHL27-RNAi-Linie nach Langzeitinduktion gebildeten ROS als mögliche Regulatoren der ALA-Synthese in Frage.

Die *Arabidopsis* Doppelmutante *glk1:glk2* zeigte ebenfalls reduzierte Transkriptmengen von AtHEM1, was die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren für die transkriptionelle Regulation der Expression von AtHEM1 unterstreicht (Waters *et al.*, 2009). Nach 24 h Reprimierung von AtCHL27 war die Expression der Gene AtGLK1 und AtGLK2 nicht reduziert. Darüber hinaus wird ihnen auch eher eine Funktion als Regulatoren der Expression von TPBS-Genen während der Chloroplastenbiogenese zugeschrieben (Waters *et al.*, 2009),

so dass sie bei der transkriptionellen Kontrolle von *AtHEMA1* nach Kurzzeitinduktion wahrscheinlich nicht beteiligt sind.

Die CHL27-RNAi-Linie wäre ein geeignetes System, um das Zusammenspiel zwischen einer direkten Inaktivierung der GluTR durch ROS oder Häm und der ROS-vermittelten Reduktion der Expression von *AtHEMA1* zu untersuchen. Entsprechende Kinetiken von relevanten Transkriptgehalten nach Induktion der Geninaktivierung von *AtCHL27* könnten weitere Informationen über das Zusammenspiel dieser Faktoren liefern.

Trotz verminderter ALA-Syntheseraten und Veränderungen von Enzymaktivitäten im Mg-Zweig der TPBS war der *steady state*-Gehalt an Proto IX in allen RNAi-Linien nach Kurzzeitinduktion mit dem des Wildtyps vergleichbar. In diesem Zusammenhang wird AtGUN4 durch die Fähigkeit Proto IX und Mg-Porphyrine zu binden eine Funktion bei der Metabolitkanalisierung zugeschrieben (Larkin *et al.*, 2003; Peter & Grimm, 2009; Tanaka & Tanaka, 2011). Die Regulation des Proto IX Pools scheint jedenfalls innerhalb der TPBS sehr schnell zu sein. Nach Kurzzeitinduktion wurden im Rahmen der *operational control* keine Hinweise gefunden, die Proto IX eine Rolle als retrogrades Signalmolekül zuschreiben. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass als Reaktion auf Umweltreize Proto IX als *second messenger* durch sehr kurze, distinkte Erhöhungen des Gehaltes Signale vermittelt. Als freies Molekül würde Proto IX aufgrund der photoaktiven Eigenschaften außerdem zur Produktion von ROS beitragen. Die *microarray*-Analysen zeigten allerdings keine Erhöhung der Expression von ROS-Markergenen nach Kurzzeitinduktion der Geninaktivierung von *AtCHLH*, *AtCHLM* und *AtCHL27*.

4.6 Die Folgen der Langzeit-Geninaktivierung

Da Pflanzen nicht die Möglichkeit haben sich äußeren Einflüssen zu entziehen sind, sie kontinuierlich mit biotischen und abiotischen Reizen konfrontiert. Die Änderung der Lichtqualität und -quantität, der Temperatur, der Luftfeuchtigkeit sowie die Verfügbarkeit von Wasser sind einige Beispiele für ständig wechselnde Umweltbedingungen. Darüber hinaus müssen Pflanzen auf Pathogene wie Viren, Bakterien und Pilze reagieren oder mechanische Einwirkungen durch beispielsweise Insekten hinnehmen. Die Pflanzen reagieren auf diese Einflüsse mit spezifischen Veränderungen des Metabolismus und der Entwicklung hauptsächlich vermittelt durch Anpassungen der Transkription, aber auch der Translation (Reinbothe *et al.*, 2010b).

Zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse über die Langzeitfolgen einer induzierten Geninaktivierung der Zielgene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *AtCHL27* wurden in der vorliegenden Arbeit zeitlich aufgelöst Transkriptanalysen von PhANGs, ROS-Markergenen und TPBS-assoziierten Gene nach 0, 1, 2 und 4 Tagen durchgeführt. Für diese Experimente wurde die Anzucht auf MS-Platten vorgenommen, um die Keimlinge dann zeitlich versetzt auf MS-Platten mit DM zu überführen. Auf diese Weise konnte eine sehr einheitliche Applikation von DM erreicht werden, so dass sich die Keimlinge zum Zeitpunkt der Probennahme alle in einem vergleichbaren Entwicklungszustand befanden (Abbildung 18). Über den gesamten Beobachtungszeitraum waren die mRNA-Gehalte der RNAi-Zielgene *AtCHLH*, *AtCHLD*, *AtCHLM* und *ATCHL27* auf einem Niveau von unter 10 % im Vergleich zur Kontrolle. Daraus lässt sich ableiten, dass auch die Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, der Methyltransferase und der Zyklastase über 4 Tage reduziert waren. Dadurch zeigten sich ab dem 2. Tag phänotypische Unterschiede der DM-behandelten Keimlinge der RNAi-Linien, die sich nach 4 Tagen manifestiert hatten. So zeigten die Keimlinge der *CHLH*-RNAi-Linie Chlorosen, deren Ursache im stark reduzierten Metabolitfluss der TPBS liegt. Dadurch wurden unzureichende Mengen an Chlorophyll zur Neubildung und Assemblierung des Photosyntheseapparates im Zuge des Keimlingwachstums gebildet. Damit gleichen diese *Arabidopsis*-Keimlinge den Tabak *CHLH*-Antisense-Pflanzen. Die Analyse der transgenen Tabakpflanzen, die eine reduzierte ALA-Syntheserate zeigten, hat schon damals auf eine Signalgebung zur Synchronisation von frühen und späten Schritten der TPBS hingewiesen (Papenbrock *et al.*, 2000). Die Aktivität der Mg-Chelatase war in den Keimlingen der *CHLD*-RNAi-Linie nicht so stark reduziert wie bei der *CHLH*-RNAi-Linie. Entsprechend war der Phänotyp im Vergleich zur Kontrolle leicht hellgrün. Einen ähnlich hellgrünen Phänotyp hatten die Blätter der Keimlinge der *CHLM*-RNAi-Linie nach 4 Tagen DM-Behandlung. Obwohl die Aktivität der Methyltransferase stark reduziert ist und das Ausgangsprodukt MgP dadurch akkumulierte, war die Chlorophyllsyntheserate dennoch ausreichend, um einen Großteil des Bedarfs an Chlorophyll zu decken. Die Keimlinge dieser Linie waren mit Tabak *CHLM*-Antisense-Pflanzen vergleichbar. In Tabak ist der Transkriptgehalt von *LHCB* nach der Expression von *CHLM* sense oder antisense RNA erhöht bzw. erniedrigt, wobei kaum Änderungen der Mg-Porphyrin-Gehalte gefunden wurden, was auf die *feed-forward* Regulation der ALA-Synthese zurück geführt wurde (Alawady *et al.*, 2005). Entsprechend wurde die Aktivität der Methyltransferase mit transkriptionellen Aktivitäten im Cytoplasma korreliert, wobei es sich auch hier wieder um

eine konstitutive Inaktivierung von CHLM handelte, die pleiotrope Effekte zur Folge hat (Alawady & Grimm, 2005).

Die deutlichsten Veränderungen zeigten die Keimlinge der CHL27-RNAi-Linie. Die starke Akkumulation von photoaktiven Metaboliten wie MgP und MgPME führte zu deutlichen Nekrosen. Durch die Bildung von ROS wurde im Blattgewebe der programmierte Zelltod ausgelöst, wodurch als Folge größere Blattbereiche abstarben. In ihrer Eigenschaft als Signalmoleküle können ROS zur Anpassung und Feinjustierung der Photosynthese beitragen sowie Stress- und Abwehr-Antworten vermitteln (Reinbothe *et al.*, 2010b). In Chloroplasten finden sich mehrere Quellen für die Entstehung von ROS. Porphyrine wie Proto IX können nach Belichtung zu einem Triplet-Zustand angeregt werden und mit molekularem Sauerstoff zu $^1\text{O}_2$ reagieren (Reinbothe *et al.*, 2010b). Ein ähnlicher Anregungszustand von Chlorophyll im Photosystem II führte ebenfalls zur Bildung von $^1\text{O}_2$ (Krieger-Liszkay & Trebst, 2006). Die $^1\text{O}_2$ -vermittelte Regulation der NGE resultiert dann in verminderten Pflanzenwachstum oder dem programmierten Zelltod (op den Camp *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2004). Dabei sind die Signalwege eng mit der Synthese und der Signalgebung von Pflanzenhormonen wie Ethylen, Jasmonat und Salicylsäure verknüpft (Reinbothe *et al.*, 2010a). Viele Studien zur Untersuchung von retrograden Signalen basieren auf der experimentellen Strategie Mutanten der TPBS unter dem Einfluss von Stress und während der Akklimatisierung zu analysieren, um zwischen TP-, ROS- und Redox-vermittelten Modifizierungen der NGE zu unterscheiden (Meskauskiene *et al.*, 2001; Mochizuki *et al.*, 2001; Larkin *et al.*, 2003; Strand *et al.*, 2003). Durch die Akkumulation von Porphyrinen kam es bei diesen Ansätzen zu Chlorosen und Nekrosen, was gerade unter dem Einfluss von Licht zur Aktivierung eines komplexen Signalnetzwerkes führte (Nott *et al.*, 2006; Pogson *et al.*, 2008).

Die Folgen von Chlorosen und Nekrosen spiegeln sich auch in der Analyse der Transkripte von PhANGs während der Langzeitinduktion der Geninaktivierung von AtCHLH, AtCHLD, AtCHLM und AtCHL27 wieder. Die chlorotischen bis hellgrünen Keimlinge der CHLH-, CHLD- und CHLM-RNAi-Linie zeigten eine leichte Erhöhung der Transkriptgehalte der PhANGs AtLHCBI.2, AtRBCS und AtPC, wohingegen in der CHL27-RNAi-Linie diese Transkripte stark reduziert sind. Die niedrigen mRNA-Gehalte der PhANGs in der CHL27-RNAi-Linie und der nekrotische Phänotyp korrelieren jedoch mit der starken Induktion der Expression von ROS-Markergenen, bereits nach 2 Tagen Geninaktivierung von AtCHL27.

Es zeigte sich eine über 100-fache Erhöhung des Transkriptgehaltes von *AtBAP1*, einem Referenzgen für $^1\text{O}_2$ (op den Camp *et al.*, 2003). Die Akkumulation von MgPME führte unter Einwirkung von Licht zur Bildung von $^1\text{O}_2$, wodurch über den ROS-vermittelten retrograden Signalweg die Induktion der Expression dieses Gens erfolgte. Ähnlich verhielt sich *AtZAT12*, einem Referenzgen für H_2O_2 , (Rizhsky *et al.*, 2004). Mit einer leichten Verzögerung in der Induktion der Expression erreichten die Transkriptgehalte nach 4 Tagen Langzeitinduktion ähnlich hohe Werte wie die von *AtBAP1* (Abbildung 25 D). Der Vergleich mit der CHLM-RNAi-Linie zeigte, dass diese beiden Referenzgene für ROS nicht induziert wurden (Abbildung 25 C), obwohl vergleichbar große Mengen an MgP nach der Geninaktivierung von *AtCHLM* und *AtCHL27* in den Keimlingen vorlagen (Abbildung 19 B). Dadurch konnte keine Beteiligung von MgP an der Bildung von $^1\text{O}_2$ und H_2O_2 gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass MgP gebunden an beispielsweise Proteine wie GUN4 eine phototoxische Wirkung verliert. Die Bildung von $^1\text{O}_2$ in der CHL27-RNAi-Linie ist vergleichbar mit der Entstehung von $^1\text{O}_2$ durch die Akkumulation von Pchlid in der *flu*-Mutante, die nach der Dunkelphase belichtet wird. (Meskauskiene *et al.*, 2001). Entsprechend könnten hier unter der Nutzung desselben retrograden Signalweges ähnliche Muster der Anpassung der NGE vorliegen.

Die Gene *AtGPX7* und *AtFSD1* zeigten im Vergleich zu den deutlich induzierten ROS-Referenzgenen *AtBAP1* und *AtZAT12* nur leichte Veränderungen in der Expression (Abbildung 25 D). Interessanterweise wird *AtGPX7* ebenfalls als Referenzgen für H_2O_2 herangezogen (Mullineaux *et al.*, 2000), was erneut auf eine Differenzierung der ROS-Signale innerhalb der Plastiden hinweist. Eine Bildung von Superoxid im Zusammenhang mit der veränderten Aktivität der Zyklase im Mg-Zweig der TPBS ist aufgrund der unveränderten Transkriptgehalte des Referenzgens für Superoxid, *AtFSD1* (Pulido *et al.*, 2010) unwahrscheinlich.

4.7 Die Rolle von Häm nach Langzeitinduktion

Der Hämgehalt war während der Langzeitinduktion im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle in allen RNAi-Linien unverändert. Lediglich in den Keimlingen der CHL27-RNAi-Linie wurde eine Reduktion des Hämgehaltes nach 4 Tagen beobachtet (Abbildung 21). Interessanterweise hatte die stark reduzierte ALA-Syntheserate in beispielsweise den Keimlingen der CHLH-RNAi-Linie (Abbildung 22) keinen Einfluß auf den Hämgehalt. Die *steady state*-Gehalte von Häm scheinen entsprechend genauso gut reguliert zu sein wie die

von Proto IX, welche auch nur leichten Schwankungen während der Langzeitinduktion in allen vier Linien unterlagen (Abbildung 19 A).

Die Überexpression von *AtFCI* führte nach Behandlung mit NF zu einer verstärkten Expression von PhANGs im Vergleich zum NF-behandelten Wildtyp (Woodson *et al.*, 2011). Die verringerten Transkriptgehalte von *AtCHL27* führten nach 2 Tagen zu mehr als einer 10-fachen Erhöhung der *AtFCI* mRNA-Gehalte, die jedoch nach 4 Tagen bereits wieder verringert waren (Abbildung 26 D). Diese erhöhten Transkriptgehalte von *AtFCI* lassen sich nicht mit einer generellen Erhöhung von PhANG-Transkripten korrelieren. Letztlich konnte mit den angewandten Methoden nur der Gesamt-Hämgehalt in dem untersuchten Pflanzengewebe bestimmt werden. In wie weit unterschiedliche Syntheseorte innerhalb des Chloroplasten zu einer zusätzlichen Differenzierung der Häm-vermittelten retrograden Signalgebung führten, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig untersucht werden. Die Zusammenhänge und die Rolle des Häms als Signalmolekül bei der transkriptionellen und posttranslationalen Kontrolle von TPBS-Genen, konnte mit den Experimenten der Kurzzeit- und Langzeitinduktion nicht abschließend geklärt werden.

4.8 Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen

Eine Regulation der NGE als Antwort auf die Beeinträchtigung von Enzymen des Mg-Zweigs der TPBS und veränderten Gehalten von Mg-Porphyrinen wurde erst nach einer Geninaktivierung von mehr als 24 h im Rahmen der Langzeitinduktion beobachtet. Die drastisch reduzierten Gehalte von MgP, MgPME und Pchlid in der CHLH-RNAi-Linie und die Akkumulation von MgPME in der CHL27-RNAi-Linie nach Kurzzeitinduktion führten jedoch zu keiner spezifischen Anpassung der NGE. Entsprechend wurde kein Nachweis erbracht, dass Mg-Porphyrine aus der TPBS im Rahmen der *operational control* in photosynthetisch aktiven *Arabidopsis*-Keimlingen mit funktionstüchtigen Chloroplasten als primäre retrograde Signale kontinuierlich an der Regulation der NGE beteiligt waren. Verringerte Enzymaktivitäten der Mg-Chelatase, Methyltransferase und Zyklase nach Langzeitinduktion führten zu einem anhaltenden, verringerten metabolischen Fluss der TPBS und einem reduzierten Chlorophyllgehalt. Die Inaktivierung von *AtCHL27* führte zu einer ROS-vermittelten Veränderung der NGE, was bedingt durch den programmierten Zelltod schließlich zur Bildung von nekrotischen Geweben führte. Diese sekundären Effekte als Folge der spezifischen Inaktivierung von Enzymschritten des Mg-Zweigs der TPBS bewirkten eine Änderung der NGE, wobei die genauen Mechanismen im Rahmen der hier

vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden. Dennoch gibt es eine Vielzahl von Hinweisen, die auf ein Zusammenspiel von unterschiedlichen Signalwegen in einem hierarchisch organisierten Signalnetzwerk hindeuten. So können Änderungen der TPBS zusammen mit anderen Signalen durchaus zur Anpassung der NGE beitragen. Die induzierbaren RNAi-Linien sind zur Aufschlüsselung solcher Netzwerke durchaus geeignet und erlauben es, zeitlich aufgelöste Prozesse und Mechanismen zu verfolgen. Dennoch bleibt zu klären, was die Quelle für die unspezifische Deregulation der NGE in den RNAi-Linien nach Induktion mit DM ist.

Literaturverzeichnis

- Aarti, D., Tanaka, R., Ito, H. & Tanaka, A.** (2007). High light inhibits chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinate synthesis during de-etiolation in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Photochem Photobiol* 83:171-176.
- Adhikari, N.D., Orler, R., Chory, J., Froehlich, J.E. & Larkin, R.M.** (2009). Porphyrins promote the association of GENOMES UNCOUPLED 4 and a Mg-chelatase subunit with chloroplast membranes. *J Biol Chem* 284:24783-24796.
- Alabadi, D., Gallego-Bartolome, J., Orlando, L., Garcia-Carcel, L., Rubio, V., Martinez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W. *et al.*** (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* 53:324-335.
- Alawady, A., Reski, R., Yaronskaya, E. & Grimm, B.** (2005). Cloning and expression of the tobacco CHLM sequence encoding Mg protoporphyrin IX methyltransferase and its interaction with Mg chelatase. *Plant Mol Biol* 57:679-691.
- Alawady, A.E. & Grimm, B.** (2005). Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. *Plant J* 41:282-290.
- Albus, C.A., Salinas, A., Czarnecki, O., Kahlau, S., Rothbart, M., Thiele, W., Lein, W., Bock, R., Grimm, B. & Schottler, M.A.** (2012). LCAA, a novel factor required for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase accumulation and feedback control of aminolevulinic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 160:1923-1939.
- Ankele, E., Kindgren, P., Pesquet, E. & Strand, A.** (2007). In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *Plant Cell* 19:1964-1979.
- Apel, K., Santel, H.J., Redlinger, T.E. & Falk, H.** (1980). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem* 111:251-258.
- Avesani, L., Marconi, G., Morandini, F., Albertini, E., Bruschetta, M., Bortesi, L., Pezzotti, M. & Porceddu, A.** (2007). Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* 16:587-597.
- Avissar, Y.J. & Moberg, P.A.** (1995). The common origins of the pigments of life-early steps of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res* 44:221-242.
- Baginsky, S. & Gruissem, W.** (2009). The chloroplast kinase network: new insights from large-scale phosphoproteome profiling. *Mol Plant* 2:1141-1153.

- Baier, M. & Dietz, K.J.** (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *J Exp Bot* 56:1449-1462.
- Baier, M., Stroher, E. & Dietz, K.J.** (2004). The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45:997-1006.
- Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schurmann, P. & Buchanan, B.B.** (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:370-375.
- Barajas-Lopez Jde, D., Blanco, N.E. & Strand, A.** (2013). Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochim Biophys Acta* 1833:425-437.
- Baruah, A., Simkova, K., Apel, K. & Laloi, C.** (2009). *Arabidopsis* mutants reveal multiple singlet oxygen signaling pathways involved in stress response and development. *Plant Mol Biol* 70:547-563.
- Battersby, A.R., Fookes, C.J., Matcham, G.W. & McDonald, E.** (1980). Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle. *Nature* 285:17-21.
- Battersby, A.R., Fookes, C.J.R., Gustafson-Potter, K.E., Matcham, G.W.J. & McDonald, E.** (1979). Proof by synthesis that un rearranged hydroxymethylbilane is the product from deaminase and the substrate for cosynthetase in the biosynthesis of uro'gen-III. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*:1155-1158.
- Beck, C.F.** (2005). Signaling pathways from the chloroplast to the nucleus. *Planta* 222:743-756.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Ser. B* 289-300.
- Birnboim, H.C. & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Block, M.A., Tewari, A.K., Albrieux, C., Marechal, E. & Joyard, J.** (2002). The plant S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. *Eur J Biochem* 269:240-248.
- Borghi, L., Gutzat, R., Futterer, J., Laizet, Y., Hennig, L. & Gruissem, W.** (2010). *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell* 22:1792-1811.

- Brindley, A.A., Raux, E., Leech, H.K., Schubert, H.L. & Warren, M.J.** (2003). A story of chelatase evolution: identification and characterization of a small 13-15-kDa "ancestral" cobaltochelatase (CbiXS) in the archaea. *J Biol Chem* 278:22388-22395.
- Brzezowski, P., Richter, A.S. & Grimm, B.** (2015). Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochim Biophys Acta* 1847:968-985.
- Brzezowski, P., Schlicke, H., Richter, A., Dent, R.M., Niyogi, K.K. & Grimm, B.** (2014). The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 79:285-298.
- Busch, A.W. & Montgomery, B.L.** (2015). Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response. *Redox biology* 4:260-271.
- Castillon, A., Shen, H. & Huq, E.** (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12:514-521.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F. & Margis-Pinheiro, M.** (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and molecular biology* 35:1011-1019.
- Chan, K.X., Phua, S.Y., Crisp, P., McQuinn, R. & Pogson, B.J.** (2015). Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annu Rev Plant Biol.*
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P. & Achard, P.** (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:1849-1860.
- Chi, W., Sun, X. & Zhang, L.** (2013). Intracellular signaling from plastid to nucleus. *Annu Rev Plant Biol* 64:559-582.
- Chiu, F.Y., Chen, Y.R. & Tu, S.L.** (2010). Electrostatic interaction of phytochromobilin synthase and ferredoxin for biosynthesis of phytochrome chromophore. *J Biol Chem* 285:5056-5065.
- Chow, K.S., Singh, D.P., Roper, J.M. & Smith, A.G.** (1997). A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported in vitro into both chloroplasts and mitochondria. *J Biol Chem* 272:27565-27571.
- Chow, K.S., Singh, D.P., Walker, A.R. & Smith, A.G.** (1998). Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins. *Plant J* 15:531-541.

- Clough, S.J. & Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743.
- Cluis, C.P., Mouchel, C.F. & Hardtke, C.S.** (2004). The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J* 38:332-347.
- Cornah, J.E., Terry, M.J. & Smith, A.G.** (2003). Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends Plant Sci* 8:224-230.
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A., Jepson, I., Tsiantis, M. & Moore, I.** (2005). New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 41:899-918.
- Czarnecki, O., Glasser, C., Chen, J.G., Mayer, K.F. & Grimm, B.** (2012). Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling. *Frontiers in plant science* 3:236.
- Davis, S.J., Kurepa, J. & Vierstra, R.D.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6541-6546.
- Eden, E., Lipson, D., Yogev, S. & Yakhini, Z.** (2007). Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol* 3:e39.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z.** (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10:48.
- Estavillo, G.M., Crisp, P.A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H. *et al.*** (2011). Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:3992-4012.
- Fey, V., Wagner, R., Brautigam, K., Wirtz, M., Hell, R., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmüller, R. & Pfannschmidt, T.** (2005). Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 280:5318-5328.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J. *et al.*** (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.
- Girke, A.** (2015). Untersuchungen über Konsequenzen einer deregulierten Chlorophyllsynthese und funktionelle Analyse des YCF54/LCAA-Proteins in Cyanobakterien und Pflanzen. In: Lebenswissenschaftliche Fakultät Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin.

- Giuliano, G. & Scolnik, P.A.** (1988). Transcription of Two Photosynthesis-Associated Nuclear Gene Families Correlates with the Presence of Chloroplasts in Leaves of the Variegated Tomato ghost Mutant. *Plant Physiol* 86:7-9.
- Goslings, D., Meskauskiene, R., Kim, C., Lee, K.P., Nater, M. & Apel, K.** (2004). Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown Arabidopsis plants. *Plant J* 40:957-967.
- Gray, J.C.** (2003). Chloroplast-to-nucleus signalling: a role for Mg-protoporphyrin. *Trends Genet* 19:526-529.
- Gray, J.C., Sullivan, J.A., Wang, J.H., Jerome, C.A. & MacLean, D.** (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:135-144; discussion 144-135.
- Grimm, B.** (1998). Novel insights in the control of tetrapyrrole metabolism of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 1:245-250.
- Grimm, B., Bull, A., Welinder, K.G., Gough, S.P. & Kannangara, C.G.** (1989). Purification and partial amino acid sequence of the glutamate 1-semialdehyde aminotransferase of barley and synechococcus. *Carlsberg Res Commun* 54:67-79.
- Hanke, G. & Mulo, P.** (2013). Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant Cell Environ* 36:1071-1084.
- Hedtke, B., Alawady, A., Albacete, A., Kobayashi, K., Melzer, M., Roitsch, T., Masuda, T. & Grimm, B.** (2012). Deficiency in riboflavin biosynthesis affects tetrapyrrole biosynthesis in etiolated Arabidopsis tissue. *Plant Mol Biol* 78:77-93.
- Hedtke, B., Alawady, A., Chen, S., Bornke, F. & Grimm, B.** (2007). HEMA RNAi silencing reveals a control mechanism of ALA biosynthesis on Mg chelatase and Fe chelatase. *Plant Mol Biol* 64:733-742.
- Hellens, R., Mullineaux, P. & Klee, H.** (2000). Technical Focus:a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5:446-451.
- Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. & Brown, S.B.** (1987). THE DEGRADATION OF CHLOROPHYLL — A BIOLOGICAL ENIGMA. *New Phytologist* 107:255-302.
- Hinchigeri, S.B., Hundle, B. & Richards, W.R.** (1997). Demonstration that the BchH protein of Rhodobacter capsulatus activates S-adenosyl-L-methionine:magnesium protoporphyrin IX methyltransferase. *FEBS Lett* 407:337-342.

- Hollingshead, S., Kopečna, J., Jackson, P.J., Canniffe, D.P., Davison, P.A., Dickman, M.J., Sobotka, R. & Hunter, C.N.** (2012). Conserved chloroplast open-reading frame *ycf54* is required for activity of the magnesium protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 287:27823-27833.
- Hooper, J.K., Kahn, A., Ash, D.E., Gough, S. & Kannangara, C.G.** (1988). Biosynthesis of delta-aminolevulinate in greening barley leaves. IX. Structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition, and the catalytic mechanism of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsberg Res Commun* 53:11-25.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. & Zimmermann, P.** (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* 2008:420747.
- Huang, W., Ling, Q., Bedard, J., Lilley, K. & Jarvis, P.** (2011). In vivo analyses of the roles of essential Omp85-related proteins in the chloroplast outer envelope membrane. *Plant Physiol* 157:147-159.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K. & Quail, P.H.** (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305:1937-1941.
- Ilag, L.L., Kumar, A.M. & Soll, D.** (1994). Light regulation of chlorophyll biosynthesis at the level of 5-aminolevulinate formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6:265-275.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. & Speed, T.P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4:249-264.
- Ishikawa, A., Okamoto, H., Iwasaki, Y. & Asahi, T.** (2001). A deficiency of coproporphyrinogen III oxidase causes lesion formation in *Arabidopsis*. *Plant J* 27:89-99.
- Jacobs, J.M. & Jacobs, N.J.** (1987). Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis. Purification and partial characterization of the enzyme from barley organelles. *Biochem J* 244:219-224.
- Johanningmeier, U. & Howell, S.H.** (1984). Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein mRNA accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Possible involvement of chlorophyll synthesis precursors. *J Biol Chem* 259:13541-13549.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J. & Rolland, N.** (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* 2:1154-1180.

- Jung, H.S. & Chory, J.** (2010). Signaling between chloroplasts and the nucleus: can a systems biology approach bring clarity to a complex and highly regulated pathway? *Plant Physiol* 152:453-459.
- Kagan, R.M. & Clarke, S.** (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* 310:417-427.
- Kannangara, G.C. & Gough, S.P.** (1978). Biosynthesis of Δ -aminolevulinate in greening barley leaves: Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsberg Research Communications* 43:185-194.
- Kindgren, P., Dubreuil, C. & Strand, A.** (2015). The Recovery of Plastid Function Is Required for Optimal Response to Low Temperatures in Arabidopsis. *PLoS One* 10:e0138010.
- Kindgren, P., Kremnev, D., Blanco, N.E., de Dios Barajas Lopez, J., Fernandez, A.P., Tellgren-Roth, C., Kleine, T., Small, I. & Strand, A.** (2012a). The plastid redox insensitive 2 mutant of Arabidopsis is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *Plant J* 70:279-291.
- Kindgren, P., Noren, L., Lopez Jde, D., Shaikhali, J. & Strand, A.** (2012b). Interplay between Heat Shock Protein 90 and HY5 controls PhANG expression in response to the GUN5 plastid signal. *Mol Plant* 5:901-913.
- Kleine, T., Voigt, C. & Leister, D.** (2009). Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends Genet* 25:185-192.
- Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Sato, M., Toyooka, K., Keranen, M., Aro, E.M., Fukaki, H., Ohta, H., Sugimoto, K. *et al.*** (2012). Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 24:1081-1095.
- Kobayashi, K., Fujii, S., Sasaki, D., Baba, S., Ohta, H., Masuda, T. & Wada, H.** (2014). Transcriptional regulation of thylakoid galactolipid biosynthesis coordinated with chlorophyll biosynthesis during the development of chloroplasts in Arabidopsis. *Frontiers in plant science* 5:272.
- Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. & Tanaka, K.** (2009). Tetrapyrrole signal as a cell-cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:803-807.
- Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A. & Lagarias, J.C.** (2001). The Arabidopsis HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* 13:425-436.

- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. & Chory, J.** (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316:715-719.
- Krieger-Liszkay, A. & Trebst, A.** (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *J Exp Bot* 57:1677-1684.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. & Beck, C.F.** (1997). Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14168-14172.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. & Beck, C.F.** (2000). Chloroplast signalling in the light induction of nuclear HSP70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/nucleus. *Plant J* 24:523-531.
- Kumar, A.M., Csankovszki, G. & Soll, D.** (1996). A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 30:419-426.
- La Rocca, N., Rascio, N., Oster, U. & Rüdiger, W.** (2001). Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of Lhc and RbcS genes. *Planta* 213:101-108.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lange, N., Jichlinski, P., Zellweger, M., Forrer, M., Marti, A., Guillou, L., Kucera, P., Wagnières, G. & Bergh, H.v.d.** (1999). Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolaevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX: a pilot study. *British Journal of Cancer* 80:185-193.
- Larkin, R.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Chory, J.** (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* 299:902-906.
- Lee, H.W. & Kim, J.** (2013). EXPANSINA17 up-regulated by LBD18/ASL20 promotes lateral root formation during the auxin response. *Plant Cell Physiol* 54:1600-1611.
- Lee, K.P., Kim, C., Landgraf, F. & Apel, K.** (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10270-10275.
- Leister, D.** (2005). Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends Genet* 21:655-663.

- Lemaire, S.D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. & Issakidis-Bourguet, E.** (2007). Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* 51:343-365.
- Leong, S.A., Ditta, G.S. & Helinski, D.R.** (1982). Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* 257:8724-8730.
- Lepisto, A., Kangasjarvi, S., Luomala, E.M., Brader, G., Sipari, N., Keranen, M., Keinanen, M. & Rintamaki, E.** (2009). Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:1261-1276.
- Li, L. & Wurtele, E.S.** (2015). The QQS orphan gene of *Arabidopsis* modulates carbon and nitrogen allocation in soybean. *Plant Biotechnol J* 13:177-187.
- Little, H.N. & Jones, O.T.** (1976). The subcellular localization and properties of the ferrochelatase of etiolated barley. *Biochem J* 156:309-314.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25:402-408.
- Luo, T., Fan, T., Liu, Y., Rothbart, M., Yu, J., Zhou, S., Grimm, B. & Luo, M.** (2012). Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHLI subunit and modulates redox-mediated signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants. *Plant Physiol* 159:118-130.
- Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y. & Decottignies, P.** (2006). Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin. *Proteomics* 6:6528-6537.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. & Penny, D.** (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12246-12251.
- Matringe, M., Camadro, J.M., Joyard, J. & Douce, R.** (1994). Localization of ferrochelatase activity within mature pea chloroplasts. *J Biol Chem* 269:15010-15015.
- Matsumoto, F., Obayashi, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Takamiya, K. & Masuda, T.** (2004). Gene expression profiling of the tetrapyrrole metabolic pathway in *Arabidopsis* with a mini-array system. *Plant Physiol* 135:2379-2391.
- Mauzerall, D. & Granick, S.** (1956). The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* 219:435-446.

- Mayfield, S.P., Nelson, T. & Taylor, W.C.** (1986). The Fate of Chloroplast Proteins during Photooxidation in Carotenoid-Deficient Maize Leaves. *Plant Physiol* 82:760-764.
- Mayfield, S.P. & Taylor, W.C.** (1984). Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA. *Eur J Biochem* 144:79-84.
- McCormac, A.C. & Terry, M.J.** (2002). Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of HEMA1 and Lhcb during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 32:549-559.
- McCormac, A.C. & Terry, M.J.** (2004). The nuclear genes Lhcb and HEMA1 are differentially sensitive to plastid signals and suggest distinct roles for the GUN1 and GUN5 plastid-signalling pathways during de-etiolation. *Plant J* 40:672-685.
- Mense, S.M. & Zhang, L.** (2006). Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res* 16:681-692.
- Meskauskiene, R. & Apel, K.** (2002). Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU. *FEBS Lett* 532:27-30.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R. & Apel, K.** (2001). FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12826-12831.
- Mhuirheartaigh, E.M.N., Giordani, S., MacKernan, D., King, S.M., Rickard, D., Val Verde, L.M., Senge, M.O. & Blau, W.J.** (2011). Molecular Engineering of Nonplanar Porphyrin and Carbon Nanotube Assemblies: A Linear and Nonlinear Spectroscopic and Modeling Study. *Journal of Nanotechnology* 2011:12.
- Mochizuki, N., Brusslan, J.A., Larkin, R., Nagatani, A. & Chory, J.** (2001). *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2053-2058.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A.G., Tanaka, A. & Terry, M.J.** (2010). The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* 15:488-498.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. & Nagatani, A.** (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15184-15189.

- Moller, S.G., Kunkel, T. & Chua, N.H.** (2001). A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling. *Genes Dev* 15:90-103.
- Monti, D., Nardis, S. & Paolesse, R.** (2008). Tetrapyrrole in Action: Functional Materials from the Ordered Assemblies of Porphyrin Derivatives. Meeting Abstracts MA2008-01:1099.
- Moon, J., Zhu, L., Shen, H. & Huq, E.** (2008). PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9433-9438.
- Moore, I., Samalova, M. & Kurup, S.** (2006). Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J* 45:651-683.
- Moulin, M., McCormac, A.C., Terry, M.J. & Smith, A.G.** (2008). Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15178-15183.
- Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. & Karpinski, S.** (2000). Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:1531-1540.
- Mullineaux, P.M., Karpinski, S. & Baker, N.R.** (2006). Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiol* 141:346-350.
- Muramoto, T., Kohchi, T., Yokota, A., Hwang, I. & Goodman, H.M.** (1999). The Arabidopsis photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell* 11:335-348.
- Nandi, D.L. & Shemin, D.** (1968). δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase of *Rhodospseudomonas spheroides* : III. MECHANISM OF PORPHOBILINOGEN SYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry* 243:1236-1242.
- Norris, J.R., Scheer, H., Druyan, M.E. & Katz, J.J.** (1974). An electron-nuclear double resonance (ENDOR) study of the special pair model for photo-reactive chlorophyll in photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:4897-4900.
- Nott, A., Jung, H.S., Koussevitzky, S. & Chory, J.** (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol* 57:739-759.
- Oelmuller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V.K. & Mohr, H.** (1986). Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* 168:482-492.

- Oelmüller, R. & Mohr, H.** (1986). Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* 167:106-113.
- op den Camp, R.G., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I. *et al.*** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:2320-2332.
- Oster, U., Brunner, H. & Rüdiger, W.** (1996). The greening process in cress seedlings. V. Possible interference of chlorophyll precursors, accumulated after thujaplicin treatment, with light-regulated expression of Lhc genes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 36:255-261.
- Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A. & Rudiger, W.** (2000). Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 21:305-310.
- Papenbrock, J., Mock, H.P., Tanaka, R., Kruse, E. & Grimm, B.** (2000). Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Plant Physiol* 122:1161-1169.
- Perez-Ruiz, J.M. & Cejudo, F.J.** (2009). A proposed reaction mechanism for rice NADPH thioredoxin reductase C, an enzyme with protein disulfide reductase activity. *FEBS Lett* 583:1399-1402.
- Perez-Ruiz, J.M., Guinea, M., Puerto-Galan, L. & Cejudo, F.J.** (2014). NADPH thioredoxin reductase C is involved in redox regulation of the Mg-chelatase I subunit in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol Plant* 7:1252-1255.
- Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. & Cejudo, F.J.** (2006). Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* 18:2356-2368.
- Peter, E. & Grimm, B.** (2009). GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis. *Mol Plant* 2:1198-1210.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A. & Allen, J.F.** (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397:625-628.
- Pinta, V., Picaud, M., Reiss-Husson, F. & Astier, C.** (2002). *Rubrivivax gelatinosus* acsF (previously orf358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester. *J Bacteriol* 184:746-753.

- Pogson, B.J., Woo, N.S., Forster, B. & Small, I.D.** (2008). Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci* 13:602-609.
- Pontier, D., Albrieux, C., Joyard, J., Lagrange, T. & Block, M.A.** (2007). Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in *Arabidopsis*. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. *J Biol Chem* 282:2297-2304.
- Pontoppidan, B. & Kannangara, C.G.** (1994). Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur J Biochem* 225:529-537.
- Porra, R.J., Schafer, W., Gad'on, N., Katheder, I., Drews, G. & Scheer, H.** (1996). Origin of the two carbonyl oxygens of bacteriochlorophyll a. Demonstration of two different pathways for the formation of ring E in *Rhodobacter sphaeroides* and *Roseobacter denitrificans*, and a common hydratase mechanism for 3-acetyl group formation. *Eur J Biochem* 239:85-92.
- Porra, R.J., Schafer, W., Katheder, I. & Scheer, H.** (1995). The derivation of the oxygen atoms of the 13(1)-oxo and 3-acetyl groups of bacteriochlorophyll a from water in *Rhodobacter sphaeroides* cells adapting from respiratory to photosynthetic conditions: evidence for an anaerobic pathway for the formation of isocyclic ring E. *FEBS Lett* 371:21-24.
- Poulson, R. & Polglase, W.J.** (1975). The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 250:1269-1274.
- Pulido, P., Spinola, M.C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M.B., Sahrawy, M., Sandalio, L.M., Dietz, K.J., Gonzalez, M. & Cejudo, F.J.** (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *J Exp Bot* 61:4043-4054.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylides, C. & Havaux, M.** (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5535-5540.
- Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita, Y. & Reinbothe, S.** (2010a). Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci* 15:614-624.
- Reinbothe, C., Pollmann, S. & Reinbothe, S.** (2010b). Singlet oxygen signaling links photosynthesis to translation and plant growth. *Trends Plant Sci* 15:499-506.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Apel, K. & Lebedev, N.** (1996). Evolution of chlorophyll biosynthesis--the challenge to survive photooxidation. *Cell* 86:703-705.

- Richter, A.S. & Grimm, B.** (2013). Thiol-based redox control of enzymes involved in the tetrapyrrole biosynthesis pathway in plants. *Frontiers in plant science* 4:371.
- Richter, A.S., Peter, E., Rothbart, M., Schlicke, H., Toivola, J., Rintamaki, E. & Grimm, B.** (2013). Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* 162:63-73.
- Richter, N., Zepeck, F. & Kroutil, W.** (2015). Cobalamin-dependent enzymatic O-, N-, and S-demethylation. *Trends Biotechnol* 33:371-373.
- Rissler, H.M., Collakova, E., DellaPenna, D., Whelan, J. & Pogson, B.J.** (2002). Chlorophyll biosynthesis. Expression of a second chl I gene of magnesium chelatase in Arabidopsis supports only limited chlorophyll synthesis. *Plant Physiol* 128:770-779.
- Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H. & Mittler, R.** (2004). The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *J Biol Chem* 279:11736-11743.
- Rodermel, S.** (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci* 6:471-478.
- Rodermel, S. & Park, S.** (2003). Pathways of intracellular communication: tetrapyrroles and plastid-to-nucleus signaling. *Bioessays* 25:631-636.
- Rodriguez, V.M., Chetelat, A., Majcherczyk, P. & Farmer, E.E.** (2010). Chloroplastic phosphoadenosine phosphosulfate metabolism regulates basal levels of the prohormone jasmonic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 152:1335-1345.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. & Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:675-709.
- Rüdiger, W.** (1997). Chlorophyll metabolism: From outer space down to the molecular level. *Phytochemistry* 46:1151-1167.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. & Baulcombe, D.C.** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10:937-946.
- Runge, S.** (2000). Synthese, Reaktivität und Funktionalisierung alkylsubstituierter Porphyrine.
- Sambrook, J. & Russell, D.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Schlicke, H., Hartwig, A.S., Firtzlaff, V., Richter, A.S., Glasser, C., Maier, K., Finkemeier, I. & Grimm, B.** (2014). Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. *Mol Plant* 7:1211-1227.
- Schneegurt, M.A. & Beale, S.I.** (1992). Origin of the chlorophyll b formyl oxygen in *Chlorella vulgaris*. *Biochemistry* 31:11677-11683.
- Schonberg, A. & Baginsky, S.** (2012). Signal integration by chloroplast phosphorylation networks: an update. *Frontiers in plant science* 3:256.
- Seehra, J.S., Jordan, P.M. & Akhtar, M.** (1983). Anaerobic and aerobic coproporphyrinogen III oxidases of *Rhodospseudomonas spheroides*. Mechanism and stereochemistry of vinyl group formation. *Biochem J* 209:709-718.
- Serrato, A.J., Fernandez-Trijueque, J., Barajas-Lopez, J.D., Chueca, A. & Sahrawy, M.** (2013). Plastid thioredoxins: a "one-for-all" redox-signaling system in plants. *Frontiers in plant science* 4:463.
- Serrato, A.J., Perez-Ruiz, J.M., Spinola, M.C. & Cejudo, F.J.** (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 279:43821-43827.
- Shemin, D. & Kikuchi, G.** (1958). Enzymatic synthesis of sigma-aminolevulinic acid. *Ann N Y Acad Sci* 75:122-128.
- Shepherd, M. & Hunter, C.N.** (2004). Transient kinetics of the reaction catalysed by magnesium protoporphyrin IX methyltransferase. *Biochem J* 382:1009-1013.
- Shepherd, M., McLean, S. & Hunter, C.N.** (2005). Kinetic basis for linking the first two enzymes of chlorophyll biosynthesis. *FEBS J* 272:4532-4539.
- Singh, D.P., Cornah, J.E., Hadingham, S. & Smith, A.G.** (2002). Expression analysis of the two ferrochelatase genes in *Arabidopsis* in different tissues and under stress conditions reveals their different roles in haem biosynthesis. *Plant Mol Biol* 50:773-788.
- Small, I.** (2007). RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr Opin Biotechnol* 18:148-153.
- Smith, A.G., Santana, M.A., Wallace-Cook, A.D., Roper, J.M. & Labbe-Bois, R.** (1994). Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant. *J Biol Chem* 269:13405-13413.

- Smyth, G.K.** (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3:Article3.
- Stenbaek, A. & Jensen, P.E.** (2010). Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry* 71:853-859.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J.R. & Chory, J.** (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* 421:79-83.
- Susek, R.E., Ausubel, F.M. & Chory, J.** (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74:787-799.
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida, K. & Okada, K.** (1998). Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12719-12723.
- Tanaka, R., Kobayashi, K. & Masuda, T.** (2011). Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 9:e0145.
- Tanaka, R. & Tanaka, A.** (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:321-346.
- Tanaka, R. & Tanaka, A.** (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim Biophys Acta* 1807:968-976.
- Terry, M.J., Linley, P.J. & Kohchi, T.** (2002). Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans* 30:604-609.
- Terry, M.J. & Smith, A.G.** (2013). A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Frontiers in plant science* 4:14.
- Tian, Q., Uhler, N.J. & Reed, J.W.** (2002). Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 14:301-319.
- Tripathy, B.C. & Rebeiz, C.A.** (1988). Chloroplast Biogenesis 60 : Conversion of Divinyl Protochlorophyllide to Monovinyl Protochlorophyllide in Green(ing) Barley, a Dark Monovinyl/Light Divinyl Plant Species. *Plant Physiol* 87:89-94.

- Vinti, G., Hills, A., Campbell, S., Bowyer, J.R., Mochizuki, N., Chory, J. & Lopez-Juez, E.** (2000). Interactions between *hyl* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signalling. *Plant J* 24:883-894.
- Voigt, C., Oster, U., Bornke, F., Jahns, P., Dietz, K.J., Leister, D. & Kleine, T.** (2010). In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling. *Physiol Plant* 138:503-519.
- von Gromoff, E.D., Alawady, A., Meinecke, L., Grimm, B. & Beck, C.F.** (2008). Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 20:552-567.
- von Gromoff, E.D., Schroda, M., Oster, U. & Beck, C.F.** (2006). Identification of a plastid response element that acts as an enhancer within the *Chlamydomonas* HSP70A promoter. *Nucleic Acids Res* 34:4767-4779.
- von Wettstein, D., Gough, S. & Kannangara, C.G.** (1995). Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* 7:1039-1057.
- Vothknecht, U.C., Kannangara, C.G. & von Wettstein, D.** (1996). Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9287-9291.
- Vothknecht, U.C., Kannangara, C.G. & von Wettstein, D.** (1998). Barley glutamyl tRNA^{Glu} reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity. *Phytochemistry* 47:513-519.
- Wagner, D., Przybyla, D., Op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K.P., Wursch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E. *et al.*** (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 306:1183-1185.
- Walker, C.J., Castelfranco, P.A. & Whyte, B.J.** (1991). Synthesis of divinyl protochlorophyllide. Enzymological properties of the Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase system. *Biochem J* 276 (Pt 3):691-697.
- Walker, C.J. & Willows, R.D.** (1997). Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem J* 327 (Pt 2):321-333.
- Waters, M.T., Wang, P., Korkaric, M., Capper, R.G., Saunders, N.J. & Langdale, J.A.** (2009). GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:1109-1128.
- Watson, J.M., Fusaro, A.F., Wang, M. & Waterhouse, P.M.** (2005). RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett* 579:5982-5987.

- Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P. & Helliwell, C.** (2005). A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnol J* 3:583-590.
- Woodson, J.D., Perez-Ruiz, J.M. & Chory, J.** (2011). Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Curr Biol* 21:897-903.
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, E.E., Chehab, W.E., Hayden, D.M., Tolstikov, V., Corwin, J.A., Kliebenstein, D.J., Keasling, J.D. & Dehesh, K.** (2012). Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell* 149:1525-1535.
- Zhang, H., Li, J., Yoo, J.H., Yoo, S.C., Cho, S.H., Koh, H.J., Seo, H.S. & Paek, N.C.** (2006). Rice Chlorina-1 and Chlorina-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development. *Plant Mol Biol* 62:325-337.
- Zhang, Z.W., Yuan, S., Feng, H., Xu, F., Cheng, J., Shang, J., Zhang, D.W. & Lin, H.H.** (2011). Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANGs - New evidence for the signaling role of tetrapyrroles in mature Arabidopsis plants. *J Plant Physiol* 168:714-721.
- Zhong, S., Shi, H., Xue, C., Wei, N., Guo, H. & Deng, X.W.** (2014). Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:3913-3920.
- Zhong, S., Zhao, M., Shi, T., Shi, H., An, F., Zhao, Q. & Guo, H.** (2009). EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of Arabidopsis seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21431-21436.
- Zimmermann, P., Laule, O., Schmitz, J., Hruz, T., Bleuler, S. & Gruissem, W.** (2008). Genevestigator transcriptome meta-analysis and biomarker search using rice and barley gene expression databases. *Mol Plant* 1:851-857.
- Zou, L.P., Sun, X.H., Zhang, Z.G., Liu, P., Wu, J.X., Tian, C.J., Qiu, J.L. & Lu, T.G.** (2011). Leaf rolling controlled by the homeodomain leucine zipper class IV gene Roc5 in rice. *Plant Physiol* 156:1589-1602.

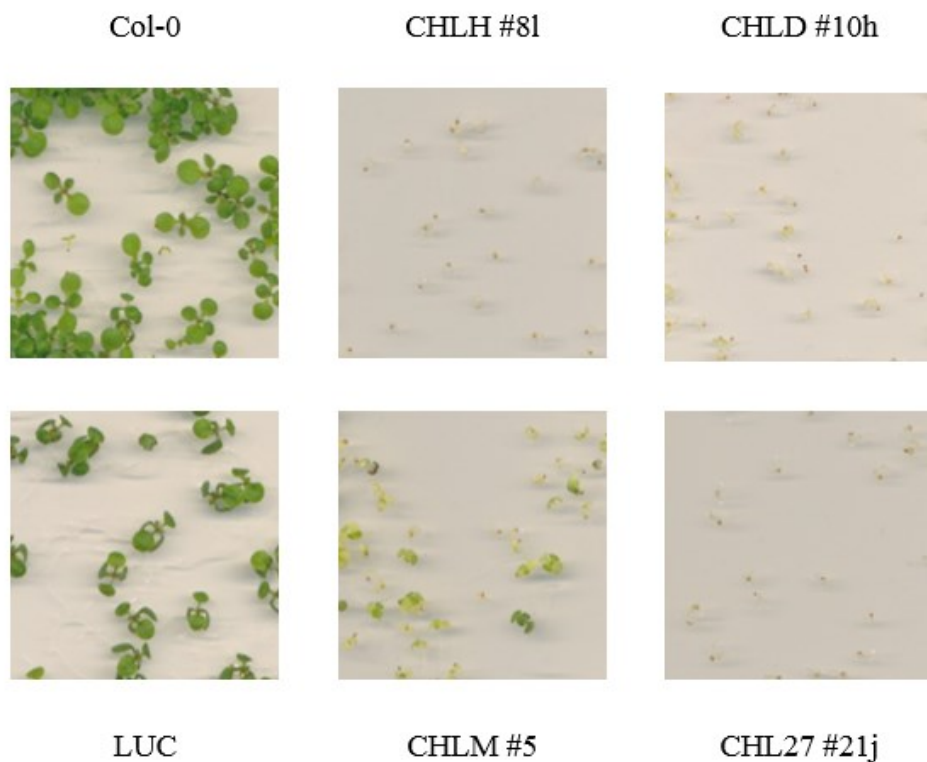
Anhang

Abbildung 27: Repräsentative Keimlinge des Wildtyp und der RNAi-Linien nach kontinuierlicher Applikation von DM.

Zehn Tage alte Keimlinge des Wildtyp und der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLD-RNAi-Linie #10h, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j sowie LUC-RNAi-Linie wurden auf MS-Medium mit Dexamethason ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) bei $100 \mu\text{E}$ Dauerlicht angezogen.



Abbildung 28: Gegenüberstellung der *microarray*-Daten in einer *heatmap* von 99 einheitlich deregulierten Genen der RNAi-Linien.

Insgesamt 99 Gene zeigen eine mindestens zweifache Veränderung der mRNA-Gehalte in allen vier RNAi-Linien 24 h nach Behandlung mit DM im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp. Die *heatmap* stellt die logFC Werte der 99 Gene farbkodiert für alle vier RNAi-Linien gegenüber.

| Gegenüberstellung der <i>Fold Change</i> Daten | | | | Gegenüberstellung der <i>Fold Change</i> Daten | | | | Gegenüberstellung der <i>Fold Change</i> Daten | | | |
|--|---|------|-------|--|---|------|-------|--|---|-------|-------|
| Gen | Annotation | CHLH | LUC | Gen | Annotation | CHLM | LUC | Gen | Annotation | CHL27 | LUC |
| AT3G44970 | Cytochrome P450 superfamily protein | 8,66 | 3,79 | AT3G44970 | Cytochrome P450 superfamily protein | 3,60 | 3,79 | AT5G24210 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 2,55 | 4,68 |
| AT3G50480 | homolog of BFW3.4 | 2,95 | 39,75 | AT4G18900 | Protein kinase superfamily protein | 2,62 | 4,25 | AT3G29575 | ABI fire binding protein 3 | 2,43 | 10,89 |
| AT2G29120 | glutamate receptor 2 | 2,65 | 7,42 | AT3G50480 | homolog of BFW3.4 | 2,56 | 39,75 | AT5G02260 | expansin A9 | 2,30 | 3,66 |
| AT1G65920 | Regulator of chromosome condensation (RCC1) family | 2,63 | 2,07 | AT1G65920 | Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain | 2,54 | 2,07 | AT4G18280 | glycine-rich cell wall protein-related | 2,12 | 3,62 |
| AT5G07690 | nrb domain protein 29 | 2,55 | 4,39 | AT2G29120 | glutamate receptor 2 | 2,39 | 7,42 | AT5G09030 | Protein kinase superfamily protein | 2,10 | 3,10 |
| AT1G66090 | Disease resistance protein (CTR-NBS class) | 2,52 | 3,48 | AT5G26270 | Ubiquitin protein | 2,36 | 53,93 | AT5G41700 | ubiquitin conjugating enzyme 8 | 2,05 | 3,56 |
| AT1G12200 | Flavin-binding monooxygenase family protein | 2,52 | 3,71 | AT4G14400 | ubiquitin repeat family protein | 2,34 | 10,23 | AT4G15680 | Thioredoxin superfamily protein | 2,05 | 2,68 |
| AT3G06760 | Drought-responsive family protein | 2,40 | 3,02 | AT5G05270 | Chalcone-flavanone isomerase family protein | 2,33 | 3,33 | AT4G15620 | Ubiquitin-related protein family (UPP497) | 2,03 | 3,26 |
| AT3G13110 | serine acetyltransferase 2.2 | 2,33 | 2,74 | AT3G29575 | ABI fire binding protein 3 | 2,21 | 10,89 | AT1G09910 | Rhamnogalacturonate lyase family protein | 2,02 | 2,56 |
| AT5G24210 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 2,33 | 4,68 | AT1G73880 | UDP-glucosyl transferase 81B1 | 2,17 | 3,89 | AT5G23570 | XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein-related | 0,50 | 0,27 |
| AT3G06130 | Proximal phosphate (PLP)-dependent transferase superfamily protein | 2,30 | 2,35 | AT3G06130 | Proximal phosphate (PLP)-dependent transferase superfamily protein | 2,16 | 2,35 | AT1G09400 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein | 0,49 | 0,44 |
| AT5G05270 | Chalcone-flavanone isomerase family protein | 2,29 | 3,33 | AT1G12200 | Flavin-binding monooxygenase family protein | 2,12 | 3,71 | AT2G28600 | ubiquitin-like 2 precursor | 0,49 | 0,33 |
| AT4G04220 | receptor like protein 46 | 2,27 | 3,21 | AT5G02260 | expansin A9 | 2,10 | 3,66 | AT1G26260 | cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 5 | 0,49 | 0,45 |
| AT5G39030 | Protein kinase superfamily protein | 2,24 | 3,10 | AT4G15620 | Ubiquitin-related protein family (UPP497) | 2,09 | 3,26 | AT2G01400 | Ubiquitin protein | 0,47 | 0,38 |
| AT4G22212 | Arabidopsis domain-like protein | 2,22 | 2,57 | AT5G10400 | Histone superfamily protein | 2,08 | 6,06 | AT2G24390 | AJ22-like (auxin-induced gene) family protein | 0,45 | 0,41 |
| AT1G65370 | TRAF-like family protein | 2,16 | 3,76 | AT5G07690 | nrb domain protein 29 | 2,08 | 4,39 | AT2G16750 | Protein kinase protein with adenosine nucleotide alpha-hydroxamate-like domain | 0,45 | 0,43 |
| AT2G27360 | Histone superfamily protein | 2,14 | 2,89 | AT3G44890 | ubiquitin protein L8 | 2,04 | 5,24 | AT5G59330 | Bifunctional adenosine/uridine transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,45 | 0,37 |
| AT3G14210 | epithiospecifier modifier 1 | 2,13 | 2,30 | AT2G43820 | UDP-glucosyltransferase 74F2 | 2,04 | 3,32 | AT5G19100 | Eukaryotic aspartyl protease family protein | 0,44 | 0,42 |
| AT5G10400 | Histone superfamily protein | 2,10 | 6,06 | AT3G06760 | Drought-responsive family protein | 2,03 | 3,02 | AT5G02210 | Embryo-specific protein 3, (AT53) | 0,40 | 0,38 |
| AT1G27350 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein | 2,02 | 3,25 | AT3G13110 | serine acetyltransferase 2.2 | 2,02 | 2,74 | AT3G07200 | quiescent starch | 0,38 | 8,10 |
| AT3G44890 | ubiquitin protein L9 | 2,01 | 5,24 | AT1G27350 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein | 2,01 | 3,25 | | | | |
| AT3G57710 | Protein kinase superfamily protein | 2,01 | 2,02 | AT3G14210 | epithiospecifier modifier 1 | 2,00 | 2,30 | | | | |
| AT1G78320 | glutathione S-transferase TAU 23 | 0,49 | 0,46 | AT1G24400 | Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein | 0,50 | 0,40 | | | | |
| AT5G19100 | Eukaryotic aspartyl protease family protein | 0,49 | 0,42 | AT2G01400 | Ubiquitin protein | 0,49 | 0,38 | | | | |
| AT5G24160 | equilibrin monooxygenase 6 | 0,49 | 0,22 | AT5G42840 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 0,49 | 0,46 | | | | |
| AT4G19100 | Protein of unknown function (DUF3464) | 0,46 | 0,36 | AT2G28310 | Protein of unknown function (DUF377) | 0,49 | 0,11 | | | | |
| AT5G02210 | Embryo-specific protein 3, (AT53) | 0,46 | 0,38 | AT2G16750 | Protein kinase protein with adenosine nucleotide alpha-hydroxamate-like domain | 0,48 | 0,43 | | | | |
| AT5G42840 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 0,45 | 0,46 | AT3G23550 | MATE efflux family protein | 0,47 | 0,29 | | | | |
| AT5G59330 | Bifunctional adenosine/uridine transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,40 | 0,37 | AT5G23570 | XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein-related | 0,44 | 0,27 | | | | |
| | | | | AT3G07200 | quiescent starch | 0,38 | 8,10 | | | | |

Abbildung 29: Gegenüberstellung der microarray-Daten von deregulierten Genen der CHLH- CHLM- und CHL27-RNAi-Linie und der LUC-RNAi-Linie .

Die Tabellen zeigen eine Gegenüberstellung der *fold change*-Werte deregulierter Gene der CHLH-RNAi-Linie #81, CHLM-RNAi-Linie #5 und CHL27-RNAi-Linie #21j welche ebenfalls in der LUC-RNAi-Linie dereguliert sind aber nicht zu den 99 gemeinsam deregulierten Genen in allen vier RNAi-Linien gehören (Abbildung 15) Gelb markierte Felder entsprechen im Vergleich zum DM-behandelten Wildtyp erhöhten Transkriptgehalten und blau markierte Felder entsprechend reduzierten Transkriptgehalten.

Tabelle 8: Liste der deregulierten Gene nach 24 h Reprimierung der Expression von AtCHLH

| AGI | Beschreibung | FC CHLH | pval CHLH | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| AT5G66110 | Heavy metal transport/detoxification superfamily protein | 16,06 | 0,00 | 7,45 | 0,00 |
| AT3G05640 | Protein phosphatase 2C family protein | 15,73 | 0,01 | 17,28 | 0,00 |
| AT1G26290 | Unknown protein | 10,63 | 0,01 | 3,30 | 0,01 |
| AT3G44970 | Cytochrome P450 superfamily protein | 8,66 | 0,05 | 3,79 | 0,03 |
| AT1G76240 | Arabidopsis protein of unknown function (DUF241) | 8,48 | 0,00 | 3,62 | 0,02 |
| AT1G56010 | NAC domain containing protein 1 | 7,83 | 0,01 | 3,94 | 0,00 |
| AT3G19430 | late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related | 6,95 | 0,00 | 3,77 | 0,00 |
| AT3G61490 | Pectin lyase-like superfamily protein | 6,03 | 0,02 | 2,67 | 0,01 |
| AT1G80280 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 5,04 | 0,00 | 4,85 | 0,00 |
| AT5G05290 | expansin A2 | 4,89 | 0,00 | 2,32 | 0,03 |
| AT5G07460 | peptidomethionine sulfoxide reductase 2 | 4,62 | 0,04 | 2,97 | 0,06 |
| AT1G74810 | HCO ₃ ⁻ transporter family | 4,38 | 0,00 | 17,30 | 0,01 |
| AT3G46530 | NB-ARC domain-containing disease resistance protein | 4,28 | 0,00 | 6,25 | 0,00 |
| AT2G25450 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 4,24 | 0,00 | 81,65 | 0,01 |
| AT5G50800 | Nodulin MtN3 family protein | 4,21 | 0,01 | 7,40 | 0,00 |
| AT5G55790 | Unknown protein | 4,18 | 0,00 | 7,66 | 0,00 |
| AT3G15310 | transposable element gene | 4,14 | 0,00 | 1,11 | 0,74 |
| AT2G14460 | Unknown protein | 3,82 | 0,00 | 10,61 | 0,00 |
| AT2G03710 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 3,71 | 0,00 | 5,62 | 0,00 |
| AT1G64950 | cytochrome P450, family 89, subfamily A, polypeptide 5 | 3,71 | 0,02 | 28,16 | 0,00 |
| AT4G23220 | cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 14 | 3,64 | 0,00 | 13,22 | 0,00 |

| AGI | Beschreibung | FC CHLH | pval CHLH | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| AT1G72670 | IQ-domain 8 | 3,63 | 0,00 | 2,75 | 0,00 |
| AT3G47250 | Plant protein of unknown function (DUF247) | 3,63 | 0,00 | 27,04 | 0,01 |
| AT4G32240 | Unknown protein | 3,52 | 0,00 | 16,13 | 0,00 |
| AT1G67865 | Unknown protein | 3,48 | 0,00 | 6,34 | 0,00 |
| AT1G23090 | sulfate transporter 91 | 3,48 | 0,00 | 1,82 | 0,08 |
| AT3G43740 | Leucine-rich repeat (LRR) family protein | 3,46 | 0,00 | 22,29 | 0,00 |
| AT2G01090 | Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein | 3,43 | 0,00 | 16,53 | 0,00 |
| AT3G44630 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 3,43 | 0,01 | 10,31 | 0,00 |
| AT3G44430 | Unknown protein | 3,40 | 0,00 | 4,75 | 0,00 |
| AT5G17880 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) | 3,35 | 0,00 | 6,24 | 0,00 |
| AT4G19500 | "nucleoside-triphosphatases;transmembrane receptors;nucleotide binding" | 3,33 | 0,00 | 8,58 | 0,01 |
| AT1G35612 | transposable element gene | 3,32 | 0,00 | 8,89 | 0,00 |
| AT5G17890 | DA1-related protein 4 | 3,28 | 0,00 | 2,52 | 0,01 |
| AT1G20700 | WUSCHEL related homeobox 14 | 3,28 | 0,00 | 1,51 | 0,11 |
| AT1G72920 | Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein | 3,22 | 0,00 | 1,78 | 0,07 |
| AT4G09030 | arabinogalactan protein 10 | 3,16 | 0,00 | 5,51 | 0,01 |
| AT1G19640 | jasmonic acid carboxyl methyltransferase | 3,15 | 0,01 | 1,24 | 0,26 |
| AT1G23960 | Protein of unknown function (DUF626) | 3,13 | 0,00 | 15,44 | 0,00 |
| AT1G65480 | PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein | 3,13 | 0,00 | 1,21 | 0,35 |
| AT1G73680 | alpha dioxygenase | 3,12 | 0,00 | 3,56 | 0,00 |
| AT5G63020 | Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family | 3,04 | 0,00 | 1,64 | 0,09 |
| AT1G78970 | lupeol synthase 1 | 3,03 | 0,00 | 3,22 | 0,03 |
| AT3G16750 | Unknown protein | 3,00 | 0,00 | 3,75 | 0,01 |
| AT5G24150 | FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein | 2,97 | 0,01 | 5,61 | 0,00 |
| AT3G50480 | homolog of RPW8 4 | 2,95 | 0,00 | 39,75 | 0,00 |
| AT1G66980 | suppressor of npr1-1 constitutive 4 | 2,90 | 0,04 | 6,07 | 0,00 |
| AT1G21130 | O-methyltransferase family protein | 2,89 | 0,02 | 4,33 | 0,01 |
| AT1G43590 | transposable element gene | 2,89 | 0,00 | 1,82 | 0,03 |
| AT1G13950 | eukaryotic elongation factor 5A-1 | 2,88 | 0,00 | 2,11 | 0,16 |
| AT1G70430 | Protein kinase superfamily protein | 2,85 | 0,00 | 1,76 | 0,07 |
| AT5G41140 | Myosin heavy chain-related protein | 2,84 | 0,00 | 4,18 | 0,00 |
| AT1G73490 | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein | 2,79 | 0,00 | 5,27 | 0,00 |
| AT5G40910 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,77 | 0,00 | 6,69 | 0,00 |
| AT1G63880 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,76 | 0,00 | 8,03 | 0,00 |
| AT5G36930 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,74 | 0,01 | 4,09 | 0,00 |
| AT1G58270 | TRAF-like family protein | 2,72 | 0,00 | 45,06 | 0,04 |
| AT1G13650 | Unknown protein | 2,72 | 0,01 | 3,64 | 0,12 |
| AT5G45500 | RNI-like superfamily protein | 2,71 | 0,00 | 14,08 | 0,00 |
| AT5G56380 | F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein | 2,68 | 0,00 | 5,45 | 0,00 |
| AT4G16860 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,68 | 0,00 | 11,69 | 0,00 |
| AT1G07880 | Protein kinase superfamily protein | 2,68 | 0,00 | 1,55 | 0,22 |
| AT1G22590 | AGAMOUS-like 87 | 2,67 | 0,00 | 15,86 | 0,00 |
| AT2G29120 | glutamate receptor 2 | 2,65 | 0,00 | 7,42 | 0,02 |
| AT1G66100 | Plant thionin | 2,63 | 0,00 | 8,10 | 0,27 |
| AT1G65920 | Regulator of chromosome condensation (RCC1) family | 2,63 | 0,01 | 2,07 | 0,02 |
| AT5G03840 | PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein | 2,61 | 0,00 | 1,08 | 0,71 |
| AT2G46450 | cyclic nucleotide-gated channel 12 | 2,61 | 0,00 | 1,63 | 0,10 |
| AT1G65490 | Unknown protein | 2,58 | 0,00 | 2,84 | 0,07 |
| AT4G19530 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,55 | 0,00 | 3,90 | 0,00 |
| AT5G07690 | myb domain protein 29 | 2,55 | 0,00 | 4,39 | 0,00 |
| AT5G15980 | Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein | 2,55 | 0,00 | 1,36 | 0,54 |
| AT4G08110 | transposable element gene | 2,53 | 0,00 | 2,16 | 0,01 |
| AT1G66090 | Disease resistance protein (TIR-NBS class) | 2,52 | 0,02 | 3,48 | 0,01 |
| AT1G12200 | Flavin-binding monooxygenase family protein | 2,52 | 0,02 | 3,71 | 0,01 |
| AT5G35490 | mta 1 responding up 1 | 2,52 | 0,00 | 1,60 | 0,14 |
| AT2G15050 | lipid transfer protein | 2,51 | 0,00 | 6,30 | 0,00 |
| AT3G57470 | Insulinase (Peptidase family M16) family protein | 2,47 | 0,00 | 4,60 | 0,03 |
| AT4G22930 | pyrimidin 4 | 2,46 | 0,00 | 4,75 | 0,00 |
| AT4G24040 | trehalase 1 | 2,45 | 0,01 | 0,49 | 0,08 |
| AT4G23680 | Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein | 2,44 | 0,00 | 9,93 | 0,00 |
| AT1G69550 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) | 2,42 | 0,00 | 3,61 | 0,01 |
| AT3G06760 | Drought-responsive family protein | 2,40 | 0,01 | 3,02 | 0,00 |
| AT1G59900 | pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit | 2,38 | 0,01 | 3,75 | 0,00 |
| AT4G02540 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 2,38 | 0,00 | 3,65 | 0,01 |
| AT3G13110 | "serine acetyltransferase 2;2" | 2,33 | 0,00 | 2,74 | 0,01 |
| AT5G24210 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 2,33 | 0,05 | 4,68 | 0,01 |
| AT3G52490 | Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein | 2,32 | 0,05 | 1,35 | 0,38 |
| AT3G62130 | Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein | 2,30 | 0,00 | 2,35 | 0,01 |
| AT5G05270 | Chalcone-flavanone isomerase family protein | 2,29 | 0,00 | 3,33 | 0,02 |
| AT1G67860 | Unknown protein | 2,28 | 0,00 | 1,47 | 0,33 |
| AT5G27750 | F-box/FBD-like domains containing protein | 2,28 | 0,00 | 2,11 | 0,04 |
| AT4G16950 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,27 | 0,00 | 2,28 | 0,09 |
| AT4G04220 | receptor like protein 46 | 2,27 | 0,00 | 3,21 | 0,02 |
| AT5G02140 | Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein | 2,26 | 0,00 | 1,19 | 0,40 |
| AT2G02360 | phloem protein 2-B10 | 2,26 | 0,00 | 2,19 | 0,02 |
| AT5G16220 | Octicosaepptide/Phox/Bem1p family protein | 2,25 | 0,00 | 4,00 | 0,01 |
| AT5G39030 | Protein kinase superfamily protein | 2,24 | 0,00 | 3,10 | 0,01 |

| AGI | Beschreibung | FC CHLH | pval CHLH | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| AT5G41650 | Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein | 2,24 | 0,00 | 4,76 | 0,00 |
| AT4G22212 | Arabidopsis defensin-like protein | 2,22 | 0,00 | 2,57 | 0,04 |
| AT4G14815 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 2,21 | 0,00 | 0,91 | 0,66 |
| AT2G33220 | GRIM-19 protein | 2,21 | 0,00 | 1,85 | 0,09 |
| AT1G27460 | no pollen germination related 1 | 2,20 | 0,00 | 1,36 | 0,12 |
| AT4G17370 | Oxidoreductase family protein | 2,20 | 0,02 | 2,64 | 0,06 |
| AT1G78290 | Protein kinase superfamily protein | 2,17 | 0,00 | 1,53 | 0,09 |
| AT4G13050 | Acyl-ACP thioesterase | 2,17 | 0,00 | 1,94 | 0,05 |
| AT5G35450 | Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family | 2,17 | 0,00 | 1,42 | 0,12 |
| AT3G28270 | Protein of unknown function (DUF677) | 2,17 | 0,00 | 2,71 | 0,10 |
| AT1G65370 | TRAF-like family protein | 2,16 | 0,00 | 3,76 | 0,01 |
| AT5G43760 | 3-ketoacyl-CoA synthase 20 | 2,15 | 0,00 | 1,89 | 0,02 |
| AT3G27360 | Histone superfamily protein | 2,14 | 0,00 | 2,89 | 0,00 |
| AT2G39710 | Eukaryotic aspartyl protease family protein | 2,14 | 0,00 | 1,63 | 0,04 |
| AT3G14210 | epithiospecifier modifier 1 | 2,13 | 0,00 | 2,30 | 0,03 |
| AT5G25490 | Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein | 2,13 | 0,00 | 1,51 | 0,10 |
| AT5G10400 | Histone superfamily protein | 2,10 | 0,00 | 6,06 | 0,00 |
| AT3G22120 | cell wall-plasma membrane linker protein | 2,09 | 0,01 | 1,15 | 0,51 |
| AT1G29720 | Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase | 2,09 | 0,02 | 1,62 | 0,15 |
| AT1G74210 | PLC-like phosphodiesterases superfamily protein | 2,08 | 0,00 | 1,83 | 0,02 |
| AT4G03820 | Protein of unknown function (DUF3537) | 2,07 | 0,00 | 3,86 | 0,01 |
| AT1G11260 | sugar transporter 1 | 2,07 | 0,01 | 1,23 | 0,49 |
| AT5G59540 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 2,07 | 0,00 | 4,61 | 0,00 |
| AT5G05750 | DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein | 2,07 | 0,00 | 6,30 | 0,00 |
| AT4G11850 | phospholipase D gamma 1 | 2,06 | 0,01 | 1,93 | 0,02 |
| AT2G36570 | Leucine-rich repeat protein kinase family protein | 2,05 | 0,00 | 1,85 | 0,06 |
| AT5G43740 | Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family | 2,05 | 0,00 | 2,98 | 0,05 |
| AT1G03020 | Thioredoxin superfamily protein | 2,05 | 0,00 | 1,42 | 0,11 |
| AT5G17790 | zinc finger (Ran-binding) family protein | 2,05 | 0,01 | 1,79 | 0,10 |
| AT1G65560 | Zinc-binding dehydrogenase family protein | 2,04 | 0,00 | 1,80 | 0,03 |
| AT3G01470 | homeobox 1 | 2,03 | 0,00 | 1,86 | 0,05 |
| AT3G01472 | conserved peptide upstream open reading frame 33 | 2,03 | 0,00 | 1,86 | 0,05 |
| AT1G11330 | S-locus lectin protein kinase family protein | 2,03 | 0,00 | 1,91 | 0,19 |
| AT3G19380 | plant U-box 25 | 2,03 | 0,01 | 1,13 | 0,75 |
| AT5G44580 | Unknown protein | 2,03 | 0,00 | 5,74 | 0,00 |
| AT1G23750 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein | 2,02 | 0,00 | 3,25 | 0,00 |
| AT3G44890 | ribosomal protein L9 | 2,01 | 0,00 | 5,24 | 0,00 |
| AT3G57710 | Protein kinase superfamily protein | 2,01 | 0,00 | 2,02 | 0,02 |
| AT1G31600 | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein | 2,01 | 0,00 | 3,67 | 0,00 |
| AT5G50100 | Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC | 2,00 | 0,00 | 6,68 | 0,00 |
| AT1G06160 | octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF 59 | 0,50 | 0,00 | 0,46 | 0,21 |
| AT1G22690 | Gibberellin-regulated family protein | 0,49 | 0,00 | 0,60 | 0,12 |
| AT1G78320 | glutathione S-transferase TAU 23 | 0,49 | 0,00 | 0,46 | 0,02 |
| AT3G46900 | copper transporter 2 | 0,49 | 0,00 | 0,46 | 0,03 |
| AT5G19100 | Eukaryotic aspartyl protease family protein | 0,49 | 0,00 | 0,42 | 0,01 |
| AT3G03320 | RNA-binding ASCH domain protein | 0,49 | 0,02 | 0,38 | 0,02 |
| AT1G08230 | Transmembrane amino acid transporter family protein | 0,49 | 0,00 | 1,25 | 0,28 |
| AT5G24160 | squalene monooxygenase 6 | 0,49 | 0,00 | 0,22 | 0,00 |
| AT3G03910 | glutamate dehydrogenase 3 | 0,49 | 0,00 | 0,69 | 0,08 |
| AT3G20370 | TRAF-like family protein | 0,49 | 0,00 | 1,25 | 0,24 |
| AT5G29000 | Homeodomain-like superfamily protein | 0,49 | 0,00 | 0,52 | 0,06 |
| AT4G27300 | S-locus lectin protein kinase family protein | 0,48 | 0,00 | 0,25 | 0,01 |
| AT5G01600 | ferretin 1 | 0,48 | 0,01 | 1,64 | 0,05 |
| AT3G16450 | Mannose-binding lectin superfamily protein | 0,47 | 0,00 | 0,86 | 0,71 |
| AT3G16690 | Nodulin MtN3 family protein | 0,47 | 0,01 | 0,89 | 0,65 |
| AT4G19100 | Protein of unknown function (DUF3464) | 0,46 | 0,04 | 0,36 | 0,01 |
| AT5G45040 | Cytochrome c | 0,46 | 0,00 | 0,27 | 0,00 |
| AT2G40960 | Single-stranded nucleic acid binding R3H protein | 0,46 | 0,00 | 0,27 | 0,01 |
| AT5G27240 | DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein | 0,46 | 0,00 | 0,47 | 0,06 |
| AT5G18840 | Major facilitator superfamily protein | 0,46 | 0,00 | 0,56 | 0,04 |
| AT5G62210 | Embryo-specific protein 3, (ATS3) | 0,46 | 0,00 | 0,38 | 0,01 |
| AT4G01390 | TRAF-like family protein | 0,45 | 0,00 | 0,94 | 0,83 |
| AT5G42840 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 0,45 | 0,00 | 0,46 | 0,03 |
| AT5G26280 | TRAF-like family protein | 0,43 | 0,00 | 0,63 | 0,10 |
| AT2G15042 | Leucine-rich repeat (LRR) family protein | 0,42 | 0,00 | 0,29 | 0,00 |
| AT2G01890 | purple acid phosphatase 8 | 0,42 | 0,00 | 0,83 | 0,36 |
| AT1G17960 | Threonyl-tRNA synthetase | 0,42 | 0,01 | 0,61 | 0,09 |
| AT4G22280 | F-box/RNI-like superfamily protein | 0,42 | 0,00 | 0,35 | 0,00 |
| AT1G54120 | Unknown protein | 0,42 | 0,00 | 0,56 | 0,07 |
| AT3G28320 | Protein of unknown function (DUF677) | 0,41 | 0,00 | 0,07 | 0,00 |
| AT5G46520 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 0,41 | 0,00 | 0,78 | 0,34 |
| AT5G15360 | Unknown protein | 0,41 | 0,00 | 0,60 | 0,11 |
| AT5G59330 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,40 | 0,00 | 0,37 | 0,01 |
| AT1G63540 | hydroxyproline-rich glycoprotein family protein | 0,40 | 0,01 | 0,67 | 0,22 |
| AT1G71140 | MATE efflux family protein | 0,40 | 0,00 | 0,42 | 0,04 |
| AT1G52770 | Phototropic-responsive NPH3 family protein | 0,38 | 0,00 | 0,44 | 0,22 |
| AT2G07688 | Unknown protein | 0,38 | 0,03 | 0,13 | 0,00 |

| AGI | Beschreibung | FC CHLH | pval CHLH | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| ATCG00020 | photosystem II reaction center protein A | 0,38 | 0,00 | 0,13 | 0,00 |
| AT1G62540 | flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 2 | 0,38 | 0,00 | 0,81 | 0,51 |
| AT5G59845 | Gibberellin-regulated family protein | 0,37 | 0,00 | 0,45 | 0,01 |
| AT1G13470 | Protein of unknown function (DUF1262) | 0,37 | 0,00 | 0,30 | 0,11 |
| AT2G15790 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin-40 (CYP40) / rotamase | 0,37 | 0,00 | 0,53 | 0,08 |
| AT1G70870 | Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein | 0,35 | 0,00 | 0,57 | 0,06 |
| AT4G31870 | glutathione peroxidase 7 | 0,34 | 0,00 | 0,53 | 0,16 |
| AT5G47250 | LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein | 0,33 | 0,00 | 0,32 | 0,00 |
| AT4G15440 | hydroperoxide lyase 1 | 0,30 | 0,00 | 0,27 | 0,04 |
| AT1G50290 | Unknown protein | 0,29 | 0,00 | 0,09 | 0,00 |
| AT3G46500 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 0,28 | 0,00 | 0,30 | 0,03 |
| AT2G26560 | phospholipase A 2A | 0,27 | 0,00 | 0,24 | 0,01 |
| AT2G14580 | basic pathogenesis-related protein 1 | 0,26 | 0,00 | 0,26 | 0,01 |
| AT3G48640 | Unknown protein | 0,25 | 0,00 | 0,10 | 0,00 |
| AT1G05680 | Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2 | 0,25 | 0,00 | 2,28 | 0,15 |
| AT1G02300 | Cysteine proteinases superfamily protein | 0,24 | 0,00 | 0,20 | 0,00 |
| AT5G48850 | Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein | 0,24 | 0,00 | 0,85 | 0,40 |
| AT5G10140 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 0,23 | 0,00 | 0,21 | 0,00 |
| AT1G69720 | heme oxygenase 3 | 0,22 | 0,01 | 0,16 | 0,02 |
| AT5G55570 | Unknown protein | 0,16 | 0,01 | 0,29 | 0,00 |
| AT4G37150 | methyl esterase 9 | 0,16 | 0,00 | 0,16 | 0,01 |
| AT3G28740 | Cytochrome P450 superfamily protein | 0,12 | 0,00 | 0,59 | 0,07 |
| AT4G03060 | "AOP2 (ALKENYL HYDROXALKYL PRODUCING 2) | 0,10 | 0,00 | 0,16 | 0,00 |
| AT5G23020 | 2-isopropylmalate synthase 2 | 0,10 | 0,00 | 0,04 | 0,00 |
| AT1G09420 | glucose-6-phosphate dehydrogenase 4 | 0,10 | 0,03 | 0,16 | 0,00 |
| AT1G21120 | O-methyltransferase family protein | 0,09 | 0,00 | 0,05 | 0,00 |
| AT1G62510 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,08 | 0,00 | 0,34 | 0,05 |
| AT1G54040 | epithiospecifier protein | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,00 |
| AT4G29200 | Beta-galactosidase related protein | 0,04 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| AT5G44420 | plant defensin 1 | 0,02 | 0,00 | 0,17 | 0,29 |
| AT2G15555 | other RNA | 0,02 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |

Tabelle 9: Liste der deregulierten Gene nach 24 h Reprimierung der Expression von *AtCHLM*

| AGI | Beschreibung | FC CHLM | Pval CHLM | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| AT3G05640 | Protein phosphatase 2C family protein | 15,37 | 0,00 | 17,28 | 0,00 |
| AT5G66110 | Heavy metal transport/detoxification superfamily protein | 11,63 | 0,00 | 7,45 | 0,00 |
| AT1G26290 | Unknown protein | 6,94 | 0,00 | 3,30 | 0,01 |
| AT1G76240 | Arabidopsis protein of unknown function (DUF241) | 6,26 | 0,00 | 3,62 | 0,02 |
| AT3G61490 | Pectin lyase-like superfamily protein | 5,91 | 0,00 | 2,67 | 0,01 |
| AT1G56010 | NAC domain containing protein 1 | 5,65 | 0,00 | 3,94 | 0,00 |
| AT3G19430 | late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related | 5,33 | 0,00 | 3,77 | 0,00 |
| AT2G25450 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 4,85 | 0,00 | 81,65 | 0,01 |
| AT1G80280 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 4,65 | 0,00 | 4,85 | 0,00 |
| AT5G05290 | expansin A2 | 4,63 | 0,00 | 2,32 | 0,03 |
| AT1G64950 | cytochrome P450, family 89, subfamily A, polypeptide 5 | 4,41 | 0,00 | 28,16 | 0,00 |
| AT3G46530 | NB-ARC domain-containing disease resistance protein | 4,24 | 0,00 | 6,25 | 0,00 |
| AT1G58270 | TRAF-like family protein | 3,94 | 0,00 | 45,06 | 0,04 |
| AT5G55790 | Unknown protein | 3,88 | 0,00 | 7,66 | 0,00 |
| AT1G72920 | Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein | 3,78 | 0,01 | 1,78 | 0,07 |
| AT3G47250 | Plant protein of unknown function (DUF247) | 3,65 | 0,00 | 27,04 | 0,01 |
| AT3G44970 | Cytochrome P450 superfamily protein | 3,60 | 0,00 | 3,79 | 0,03 |
| AT2G03710 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 3,60 | 0,00 | 5,62 | 0,00 |
| AT1G72670 | IQ-domain 8 | 3,54 | 0,00 | 2,75 | 0,00 |
| AT4G23220 | cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 14 | 3,52 | 0,00 | 13,22 | 0,00 |
| AT2G01090 | Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein | 3,49 | 0,00 | 16,53 | 0,00 |
| AT2G14460 | Unknown protein | 3,45 | 0,00 | 10,61 | 0,00 |
| AT3G44630 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 3,37 | 0,00 | 10,31 | 0,00 |
| AT4G19500 | nucleoside-triphosphatases;transmembrane receptors;nucleotide binding;ATP binding | 3,36 | 0,00 | 8,58 | 0,01 |
| AT4G32240 | Unknown protein | 3,35 | 0,00 | 16,13 | 0,00 |
| AT1G22590 | AGAMOUS-like 87 | 3,32 | 0,00 | 15,86 | 0,00 |
| AT3G44430 | Unknown protein | 3,25 | 0,00 | 4,75 | 0,00 |
| AT5G17890 | DA1-related protein 4 | 3,22 | 0,00 | 2,52 | 0,01 |
| AT5G17880 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) | 3,22 | 0,00 | 6,24 | 0,00 |
| AT3G43740 | Leucine-rich repeat (LRR) family protein | 3,20 | 0,00 | 22,29 | 0,00 |
| AT5G24150 | FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein | 3,10 | 0,00 | 5,61 | 0,00 |
| AT1G74810 | HCO3 ⁻ transporter family | 3,09 | 0,00 | 17,30 | 0,01 |
| AT3G16750 | Unknown protein | 3,08 | 0,00 | 3,75 | 0,01 |
| AT5G50800 | Nodulin MtN3 family protein | 3,08 | 0,00 | 7,40 | 0,00 |
| AT5G63020 | Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family | 3,05 | 0,00 | 1,64 | 0,09 |
| AT1G20700 | WUSCHEL related homeobox 14 | 3,04 | 0,00 | 1,51 | 0,11 |
| AT1G67865 | Unknown protein | 3,01 | 0,01 | 6,34 | 0,00 |
| AT1G66980 | suppressor of npr1-1 constitutive 4 | 3,01 | 0,00 | 6,07 | 0,00 |
| AT1G35612 | transposable element gene | 2,98 | 0,00 | 8,89 | 0,00 |
| AT1G23960 | Protein of unknown function (DUF626) | 2,96 | 0,00 | 15,44 | 0,00 |
| AT4G09030 | arabinogalactan protein 10 | 2,96 | 0,00 | 5,51 | 0,01 |
| AT5G40910 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,89 | 0,00 | 6,69 | 0,00 |
| AT1G73680 | alpha dioxygenase | 2,89 | 0,00 | 3,56 | 0,00 |
| AT3G15310 | transposable element gene | 2,88 | 0,00 | 1,11 | 0,74 |
| AT1G73490 | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein | 2,88 | 0,00 | 5,27 | 0,00 |
| AT4G23680 | Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein | 2,85 | 0,01 | 9,93 | 0,00 |
| AT5G41140 | Myosin heavy chain-related protein | 2,78 | 0,00 | 4,18 | 0,00 |
| AT1G66100 | Plant thionin | 2,75 | 0,02 | 8,10 | 0,27 |
| AT1G19640 | jasmonic acid carboxyl methyltransferase | 2,73 | 0,01 | 1,24 | 0,26 |
| AT1G69550 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) | 2,73 | 0,00 | 3,61 | 0,01 |
| AT4G16860 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,70 | 0,00 | 11,69 | 0,00 |
| AT5G07460 | peptidomethionine sulfoxide reductase 2 | 2,69 | 0,00 | 2,97 | 0,06 |
| AT1G21130 | O-methyltransferase family protein | 2,68 | 0,00 | 4,33 | 0,01 |
| AT1G63880 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,67 | 0,00 | 8,03 | 0,00 |
| AT1G70430 | Protein kinase superfamily protein | 2,67 | 0,00 | 1,76 | 0,07 |
| AT1G03020 | Thioredoxin superfamily protein | 2,67 | 0,00 | 1,42 | 0,11 |
| AT3G28270 | Protein of unknown function (DUF677) | 2,67 | 0,01 | 2,71 | 0,10 |
| AT1G65480 | PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein | 2,65 | 0,00 | 1,21 | 0,35 |
| AT5G45500 | RNI-like superfamily protein | 2,64 | 0,00 | 14,08 | 0,00 |
| AT5G36930 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,63 | 0,00 | 4,09 | 0,00 |
| AT5G56380 | F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein | 2,62 | 0,00 | 5,45 | 0,00 |
| AT4G11890 | Protein kinase superfamily protein | 2,62 | 0,03 | 4,25 | 0,01 |
| AT3G57470 | Insulinase (Peptidase family M16) family protein | 2,61 | 0,00 | 4,60 | 0,03 |
| AT1G13950 | eukaryotic elongation factor 5A-1 | 2,59 | 0,00 | 2,11 | 0,16 |
| AT3G50480 | homolog of RPW8 4 | 2,56 | 0,03 | 39,75 | 0,00 |
| AT1G65920 | Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain | 2,54 | 0,00 | 2,07 | 0,02 |
| AT5G41650 | Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein | 2,52 | 0,00 | 4,76 | 0,00 |
| AT4G19530 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,48 | 0,00 | 3,90 | 0,00 |
| AT1G65490 | Unknown protein | 2,48 | 0,00 | 2,84 | 0,07 |
| AT1G23090 | sulfate transporter 91 | 2,44 | 0,00 | 1,82 | 0,08 |
| AT4G03820 | Protein of unknown function (DUF3537) | 2,44 | 0,00 | 3,86 | 0,01 |
| AT1G78970 | lupeol synthase 1 | 2,42 | 0,03 | 3,22 | 0,03 |

| AGI | Beschreibung | FC CHLM | Pval CHLM | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| AT4G08110 | transposable element gene | 2,40 | 0,00 | 2,16 | 0,01 |
| AT1G59900 | pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit | 2,40 | 0,00 | 3,75 | 0,00 |
| AT2G29120 | glutamate receptor 2 | 2,39 | 0,01 | 7,42 | 0,02 |
| AT1G35710 | Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain | 2,39 | 0,04 | 2,72 | 0,12 |
| AT5G26270 | Unknown protein | 2,36 | 0,00 | 53,93 | 0,00 |
| AT4G22930 | pyrimidin 4 | 2,35 | 0,00 | 4,75 | 0,00 |
| AT5G50100 | Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC | 2,35 | 0,00 | 6,68 | 0,00 |
| AT4G02540 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 2,35 | 0,00 | 3,65 | 0,01 |
| AT4G14400 | ankyrin repeat family protein | 2,34 | 0,01 | 10,23 | 0,00 |
| AT5G05270 | Chalcone-flavanone isomerase family protein | 2,33 | 0,04 | 3,33 | 0,02 |
| AT5G15980 | Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein | 2,31 | 0,00 | 1,36 | 0,54 |
| AT2G39710 | Eukaryotic aspartyl protease family protein | 2,31 | 0,00 | 1,63 | 0,04 |
| AT5G16220 | Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein | 2,30 | 0,00 | 4,00 | 0,01 |
| AT2G02360 | phloem protein 2-B10 | 2,29 | 0,00 | 2,19 | 0,02 |
| AT5G27750 | F-box/FBD-like domains containing protein | 2,27 | 0,00 | 2,11 | 0,04 |
| AT5G59540 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 2,27 | 0,00 | 4,61 | 0,00 |
| AT1G13650 | Unknown protein | 2,24 | 0,00 | 3,64 | 0,12 |
| AT2G46450 | cyclic nucleotide-gated channel 12 | 2,23 | 0,00 | 1,63 | 0,10 |
| AT4G17370 | Oxidoreductase family protein | 2,23 | 0,00 | 2,64 | 0,06 |
| AT3G29575 | ABI five binding protein 3 | 2,21 | 0,02 | 10,89 | 0,00 |
| AT2G33220 | GRIM-19 protein | 2,18 | 0,00 | 1,85 | 0,09 |
| AT1G73880 | UDP-glucosyl transferase 89B1 | 2,17 | 0,00 | 3,89 | 0,05 |
| AT3G05890 | Low temperature and salt responsive protein family | 2,17 | 0,00 | 1,41 | 0,42 |
| AT3G62130 | Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein | 2,16 | 0,00 | 2,35 | 0,01 |
| AT2G15050 | lipid transfer protein | 2,14 | 0,00 | 6,30 | 0,00 |
| AT5G05750 | DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein | 2,13 | 0,00 | 6,30 | 0,00 |
| AT1G67860 | Unknown protein | 2,13 | 0,00 | 1,47 | 0,33 |
| AT1G12200 | Flavin-binding monooxygenase family protein | 2,12 | 0,00 | 3,71 | 0,01 |
| AT4G24040 | trehalase 1 | 2,10 | 0,01 | 0,49 | 0,08 |
| AT5G02260 | expansin A9 | 2,10 | 0,00 | 3,66 | 0,01 |
| AT5G43760 | 3-ketoacyl-CoA synthase 20 | 2,10 | 0,00 | 1,89 | 0,02 |
| AT4G15620 | Uncharacterised protein family (UPF0497) | 2,09 | 0,00 | 3,26 | 0,02 |
| AT5G10400 | Histone superfamily protein | 2,08 | 0,00 | 6,06 | 0,00 |
| AT1G31600 | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein | 2,08 | 0,00 | 3,67 | 0,00 |
| AT5G07690 | myb domain protein 29 | 2,08 | 0,00 | 4,39 | 0,00 |
| AT4G13050 | Acyl-ACP thioesterase | 2,07 | 0,00 | 1,94 | 0,05 |
| AT3G52490 | Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein | 2,07 | 0,00 | 1,35 | 0,38 |
| AT4G16950 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,06 | 0,00 | 2,28 | 0,09 |
| AT5G44580 | Unknown protein | 2,05 | 0,00 | 5,74 | 0,00 |
| AT3G44890 | ribosomal protein L9 | 2,04 | 0,00 | 5,24 | 0,00 |
| AT2G43820 | UDP-glucosyltransferase 74F2 | 2,04 | 0,04 | 3,32 | 0,01 |
| AT3G06760 | Drought-responsive family protein | 2,03 | 0,00 | 3,02 | 0,00 |
| AT1G11260 | sugar transporter 1 | 2,03 | 0,02 | 1,23 | 0,49 |
| AT3G13110 | serine acetyltransferase 2,2 | 2,02 | 0,00 | 2,74 | 0,01 |
| AT3G62410 | CP12 domain-containing protein 2 | 2,01 | 0,00 | 1,54 | 0,39 |
| AT3G06160 | AP2/B3-like transcriptional factor family protein | 2,01 | 0,00 | 1,42 | 0,09 |
| AT1G27460 | no pollen germination related 1 | 2,01 | 0,00 | 1,36 | 0,12 |
| AT1G23750 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein | 2,01 | 0,00 | 3,25 | 0,00 |
| AT3G14210 | epithiospecifier modifier 1 | 2,00 | 0,00 | 2,30 | 0,03 |
| AT3G03910 | glutamate dehydrogenase 3 | 0,50 | 0,00 | 0,69 | 0,08 |
| AT1G22440 | Zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein | 0,50 | 0,00 | 0,40 | 0,01 |
| AT2G40960 | Single-stranded nucleic acid binding R3H protein | 0,50 | 0,01 | 0,27 | 0,01 |
| AT2G15042 | Leucine-rich repeat (LRR) family protein | 0,50 | 0,04 | 0,29 | 0,00 |
| AT5G24240 | Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase ;Ubiquitin family protein | 0,50 | 0,00 | 0,39 | 0,07 |
| AT2G01400 | Unknown protein | 0,49 | 0,00 | 0,38 | 0,01 |
| AT2G38780 | Unknown protein | 0,49 | 0,00 | 0,52 | 0,07 |
| AT3G46490 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 0,49 | 0,01 | 0,92 | 0,79 |
| AT5G42840 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 0,49 | 0,00 | 0,46 | 0,03 |
| AT3G28310 | Protein of unknown function (DUF677) | 0,49 | 0,00 | 0,11 | 0,00 |
| AT3G16450 | Mannose-binding lectin superfamily protein | 0,49 | 0,00 | 0,86 | 0,71 |
| AT2G16750 | Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain | 0,48 | 0,00 | 0,43 | 0,03 |
| AT5G27240 | DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein | 0,48 | 0,00 | 0,47 | 0,06 |
| AT1G54120 | Unknown protein | 0,47 | 0,01 | 0,56 | 0,07 |
| AT3G23550 | MATE efflux family protein | 0,47 | 0,02 | 0,29 | 0,02 |
| AT1G62540 | flavin-monoxygenase glucosinolate S-oxygenase 2 | 0,47 | 0,02 | 0,81 | 0,51 |
| AT5G18840 | Major facilitator superfamily protein | 0,47 | 0,00 | 0,56 | 0,04 |
| AT1G17960 | Threonyl-tRNA synthetase | 0,47 | 0,00 | 0,61 | 0,09 |
| AT3G28320 | Protein of unknown function (DUF677) | 0,45 | 0,01 | 0,07 | 0,00 |
| AT5G23570 | XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein-related | 0,44 | 0,00 | 0,27 | 0,01 |
| AT1G71140 | MATE efflux family protein | 0,44 | 0,02 | 0,42 | 0,04 |
| AT4G22280 | F-box/RNI-like superfamily protein | 0,44 | 0,00 | 0,35 | 0,00 |
| AT3G46900 | copper transporter 2 | 0,44 | 0,00 | 0,46 | 0,03 |
| AT3G29810 | COBRA-like protein 2 precursor | 0,44 | 0,02 | 0,86 | 0,45 |
| AT3G24360 | ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein | 0,43 | 0,01 | 0,48 | 0,16 |
| AT5G45040 | Cytochrome c | 0,43 | 0,00 | 0,27 | 0,00 |
| AT4G31870 | glutathione peroxidase 7 | 0,43 | 0,00 | 0,53 | 0,16 |
| AT5G46520 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 0,42 | 0,01 | 0,78 | 0,34 |

| AGI | Beschreibung | FC CHLM | Pval CHLM | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|------------|--------------|-----------|-------------|
| AT4G15440 | hydroperoxide lyase 1 | 0,42 | 0,01 | 0,27 | 0,04 |
| AT3G03320 | RNA-binding ASCH domain protein | 0,42 | 0,00 | 0,38 | 0,02 |
| AT5G15360 | Unknown protein | 0,42 | 0,00 | 0,60 | 0,11 |
| AT1G22690 | Gibberellin-regulated family protein | 0,41 | 0,01 | 0,60 | 0,12 |
| AT4G27300 | S-locus lectin protein kinase family protein | 0,40 | 0,00 | 0,25 | 0,01 |
| AT2G15790 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin-40 (CYP40) / rotamase | 0,39 | 0,00 | 0,53 | 0,08 |
| AT5G45820 | CBL-interacting protein kinase 20 | 0,39 | 0,00 | 1,18 | 0,86 |
| AT1G63540 | hydroxyproline-rich glycoprotein family protein | 0,39 | 0,00 | 0,67 | 0,22 |
| AT1G06160 | octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF 59 | 0,39 | 0,02 | 0,46 | 0,21 |
| AT5G47250 | LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein | 0,38 | 0,00 | 0,32 | 0,00 |
| AT5G59845 | Gibberellin-regulated family protein | 0,38 | 0,00 | 0,45 | 0,01 |
| AT4G01390 | TRAF-like family protein | 0,37 | 0,00 | 0,94 | 0,83 |
| AT1G52770 | Phototropic-responsive NPH3 family protein | 0,36 | 0,00 | 0,44 | 0,22 |
| AT1G70870 | Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein | 0,36 | 0,00 | 0,57 | 0,06 |
| AT1G13470 | Protein of unknown function (DUF1262) | 0,35 | 0,03 | 0,30 | 0,11 |
| AT1G50290 | Unknown protein | 0,33 | 0,00 | 0,09 | 0,00 |
| AT2G26560 | phospholipase A 2A | 0,31 | 0,03 | 0,24 | 0,01 |
| AT2G07688 | Unknown protein | 0,29 | 0,00 | 0,13 | 0,00 |
| ATCG00020 | photosystem II reaction center protein A | 0,29 | 0,00 | 0,13 | 0,00 |
| AT3G48640 | Unknown protein | 0,28 | 0,01 | 0,10 | 0,00 |
| AT2G14580 | basic pathogenesis-related protein 1 | 0,28 | 0,02 | 0,26 | 0,01 |
| AT3G46500 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 0,28 | 0,00 | 0,30 | 0,03 |
| AT3G28740 | Cytochrome P450 superfamily protein | 0,26 | 0,00 | 0,59 | 0,07 |
| AT1G02300 | Cysteine proteinases superfamily protein | 0,25 | 0,00 | 0,20 | 0,00 |
| AT5G48850 | Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein | 0,24 | 0,01 | 0,85 | 0,40 |
| AT3G30720 | qua-quine starch | 0,23 | 0,00 | 8,10 | 0,00 |
| AT1G69720 | heme oxygenase 3 | 0,19 | 0,00 | 0,16 | 0,02 |
| AT5G55570 | Unknown protein | 0,18 | 0,00 | 0,29 | 0,00 |
| AT5G10140 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 0,16 | 0,00 | 0,21 | 0,00 |
| AT4G37150 | methyl esterase 9 | 0,14 | 0,00 | 0,16 | 0,01 |
| AT1G62510 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,14 | 0,00 | 0,34 | 0,05 |
| AT1G09420 | glucose-6-phosphate dehydrogenase 4 | 0,12 | 0,00 | 0,16 | 0,00 |
| AT1G21120 | O-methyltransferase family protein | 0,11 | 0,00 | 0,05 | 0,00 |
| AT5G23020 | 2-isopropylmalate synthase 2 | 0,09 | 0,00 | 0,04 | 0,00 |
| AT4G03060 | AOP2 (ALKENYL HYDROXALKYL PRODUCING 2) | 0,08 | 0,00 | 0,16 | 0,00 |
| AT1G54040 | epithiospecifier protein | 0,05 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| AT4G29200 | Beta-galactosidase related protein | 0,04 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| AT5G44420 | plant defensin 1 | 0,03 | 0,00 | 0,17 | 0,29 |
| AT2G15555 | other RNA | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |

Tabelle 10: Liste der deregulierten Gene nach 24 h Reprimierung der Expression von AtCHL27

| AGI | Beschreibung | FC CHL27 | pval CHL27 | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|-------------|---------------|-----------|-------------|
| AT5G65300 | Unknown protein | 22,55 | 0,00 | 1,37 | 0,30 |
| AT3G05640 | Protein phosphatase 2C family protein | 13,26 | 0,00 | 17,28 | 0,00 |
| AT5G66110 | Heavy metal transport/detoxification superfamily protein | 8,36 | 0,00 | 7,45 | 0,00 |
| AT1G76240 | Arabidopsis protein of unknown function (DUF241) | 6,61 | 0,00 | 3,62 | 0,02 |
| AT1G26290 | Unknown protein | 4,52 | 0,00 | 3,30 | 0,01 |
| AT3G46530 | NB-ARC domain-containing disease resistance protein | 4,27 | 0,00 | 6,25 | 0,00 |
| AT1G64950 | cytochrome P450, family 89, subfamily A, polypeptide 5 | 4,11 | 0,00 | 28,16 | 0,00 |
| AT1G80280 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 4,06 | 0,00 | 4,85 | 0,00 |
| AT1G58270 | TRAF-like family protein | 4,04 | 0,00 | 45,06 | 0,04 |
| AT2G25450 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 4,02 | 0,00 | 81,65 | 0,01 |
| AT1G35612 | transposable element gene | 3,99 | 0,00 | 8,89 | 0,00 |
| AT1G56010 | NAC domain containing protein 1 | 3,96 | 0,00 | 3,94 | 0,00 |
| AT3G44630 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 3,96 | 0,00 | 10,31 | 0,00 |
| AT3G47250 | Plant protein of unknown function (DUF247) | 3,80 | 0,00 | 27,04 | 0,01 |
| AT2G01090 | Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge protein | 3,76 | 0,00 | 16,53 | 0,00 |
| AT1G72920 | Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein | 3,68 | 0,01 | 1,78 | 0,07 |
| AT4G19500 | nucleoside-triphosphatases;transmembrane receptors;nucleotide binding;ATP binding | 3,60 | 0,00 | 8,58 | 0,01 |
| AT2G03710 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 3,52 | 0,00 | 5,62 | 0,00 |
| AT5G17890 | DA1-related protein 4 | 3,50 | 0,00 | 2,52 | 0,01 |
| AT3G16770 | ethylene-responsive element binding protein | 3,50 | 0,02 | 6,85 | 0,08 |
| AT5G55790 | Unknown protein | 3,47 | 0,00 | 7,66 | 0,00 |
| AT1G22590 | AGAMOUS-like 87 | 3,46 | 0,00 | 15,86 | 0,00 |
| AT3G43740 | Leucine-rich repeat (LRR) family protein | 3,39 | 0,00 | 22,29 | 0,00 |
| AT3G19430 | late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related | 3,38 | 0,00 | 3,77 | 0,00 |
| AT4G23220 | cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 14 | 3,35 | 0,00 | 13,22 | 0,00 |
| AT5G17880 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) | 3,34 | 0,00 | 6,24 | 0,00 |
| AT4G32240 | Unknown protein | 3,26 | 0,00 | 16,13 | 0,00 |
| AT2G14460 | Unknown protein | 3,23 | 0,00 | 10,61 | 0,00 |
| AT1G65490 | Unknown protein | 3,18 | 0,00 | 2,84 | 0,07 |

| AGI | Beschreibung | FC CHL27 | pval CHL27 | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|-------------|---------------|-----------|-------------|
| AT5G40910 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 3,15 | 0,00 | 6,69 | 0,00 |
| AT1G13650 | Unknown protein | 3,09 | 0,00 | 3,64 | 0,12 |
| AT3G44430 | Unknown protein | 3,09 | 0,00 | 4,75 | 0,00 |
| AT5G41140 | Myosin heavy chain-related protein | 3,09 | 0,00 | 4,18 | 0,00 |
| AT5G63020 | Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family | 3,08 | 0,00 | 1,64 | 0,09 |
| AT5G56380 | F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein | 3,07 | 0,00 | 5,45 | 0,00 |
| AT3G05890 | Low temperature and salt responsive protein family | 3,05 | 0,00 | 1,41 | 0,42 |
| AT1G72670 | IQ-domain 8 | 3,05 | 0,00 | 2,75 | 0,00 |
| AT3G15310 | transposable element gene | 3,03 | 0,00 | 1,11 | 0,74 |
| AT1G43590 | transposable element gene | 2,99 | 0,01 | 1,82 | 0,03 |
| AT1G23960 | Protein of unknown function (DUF626) | 2,98 | 0,00 | 15,44 | 0,00 |
| AT3G16750 | Unknown protein | 2,93 | 0,00 | 3,75 | 0,01 |
| AT3G61490 | Pectin lyase-like superfamily protein | 2,89 | 0,00 | 2,67 | 0,01 |
| AT5G45500 | RNI-like superfamily protein | 2,85 | 0,00 | 14,08 | 0,00 |
| AT1G63880 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,83 | 0,00 | 8,03 | 0,00 |
| AT5G65390 | arabinogalactan protein 7 | 2,79 | 0,04 | 1,52 | 0,30 |
| AT1G74810 | HCO3- transporter family | 2,76 | 0,00 | 17,30 | 0,01 |
| AT1G73490 | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein | 2,75 | 0,00 | 5,27 | 0,00 |
| AT4G24040 | trehalase 1 | 2,74 | 0,00 | 0,49 | 0,08 |
| AT1G66980 | suppressor of npr1-1 constitutive 4 | 2,72 | 0,00 | 6,07 | 0,00 |
| AT5G57650 | eukaryotic translation initiation factor-related | 2,72 | 0,00 | 1,09 | 0,77 |
| AT5G58570 | Unknown protein | 2,71 | 0,01 | 1,40 | 0,52 |
| AT1G21130 | O-methyltransferase family protein | 2,71 | 0,00 | 4,33 | 0,01 |
| AT5G27750 | F-box/FBD-like domains containing protein | 2,61 | 0,00 | 2,11 | 0,04 |
| AT5G24210 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 2,55 | 0,00 | 4,68 | 0,01 |
| AT5G24150 | FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein | 2,53 | 0,00 | 5,61 | 0,00 |
| AT5G50100 | Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC | 2,52 | 0,00 | 6,68 | 0,00 |
| AT1G78970 | lupeol synthase 1 | 2,50 | 0,02 | 3,22 | 0,03 |
| AT3G57470 | Insulinase (Peptidase family M16) family protein | 2,49 | 0,00 | 4,60 | 0,03 |
| AT2G05540 | Glycine-rich protein family | 2,48 | 0,04 | 2,36 | 0,16 |
| AT2G38180 | SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein | 2,47 | 0,00 | 1,45 | 0,38 |
| AT5G05290 | expansin A2 | 2,47 | 0,00 | 2,32 | 0,03 |
| AT5G36930 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,47 | 0,00 | 4,09 | 0,00 |
| AT1G59900 | pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit | 2,47 | 0,00 | 3,75 | 0,00 |
| AT3G29575 | ABI five binding protein 3 | 2,43 | 0,01 | 10,89 | 0,00 |
| AT5G41650 | Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein | 2,41 | 0,00 | 4,76 | 0,00 |
| AT1G06080 | delta 9 desaturase 1 | 2,38 | 0,03 | 1,53 | 0,16 |
| AT1G67865 | Unknown protein | 2,35 | 0,02 | 6,34 | 0,00 |
| AT4G02540 | Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein | 2,34 | 0,00 | 3,65 | 0,01 |
| AT4G17370 | Oxidoreductase family protein | 2,33 | 0,00 | 2,64 | 0,06 |
| AT4G16860 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,33 | 0,00 | 11,69 | 0,00 |
| AT1G27460 | no pollen germination related 1 | 2,32 | 0,00 | 1,36 | 0,12 |
| AT2G14900 | Gibberellin-regulated family protein | 2,32 | 0,04 | 1,19 | 0,73 |
| AT1G69550 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) | 2,31 | 0,00 | 3,61 | 0,01 |
| AT5G02260 | expansin A9 | 2,30 | 0,00 | 3,66 | 0,01 |
| AT5G43760 | 3-ketoacyl-CoA synthase 20 | 2,29 | 0,00 | 1,89 | 0,02 |
| AT2G33220 | GRIM-19 protein | 2,29 | 0,00 | 1,85 | 0,09 |
| AT4G23680 | Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein | 2,28 | 0,02 | 9,93 | 0,00 |
| AT4G16950 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,28 | 0,00 | 2,28 | 0,09 |
| AT2G46450 | cyclic nucleotide-gated channel 12 | 2,27 | 0,00 | 1,63 | 0,10 |
| AT4G22930 | pyrimidin 4 | 2,25 | 0,00 | 4,75 | 0,00 |
| AT1G66100 | Plant thionin | 2,24 | 0,04 | 8,10 | 0,27 |
| AT4G08110 | transposable element gene | 2,24 | 0,00 | 2,16 | 0,01 |
| AT4G09030 | arabinogalactan protein 10 | 2,23 | 0,00 | 5,51 | 0,01 |
| AT5G65080 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 2,23 | 0,00 | 0,89 | 0,72 |
| AT5G16220 | Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein | 2,23 | 0,00 | 4,00 | 0,01 |
| AT2G15050 | lipid transfer protein | 2,23 | 0,00 | 6,30 | 0,00 |
| AT1G03020 | Thioredoxin superfamily protein | 2,22 | 0,01 | 1,42 | 0,11 |
| AT4G03820 | Protein of unknown function (DUF3537) | 2,22 | 0,00 | 3,86 | 0,01 |
| AT3G23640 | heteroglycan glucosidase 1 | 2,22 | 0,00 | 0,85 | 0,36 |
| AT1G73680 | alpha dioxygenase | 2,22 | 0,00 | 3,56 | 0,00 |
| AT4G11210 | Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein | 2,22 | 0,00 | 1,07 | 0,85 |
| AT5G44580 | Unknown protein | 2,20 | 0,00 | 5,74 | 0,00 |
| AT2G02360 | phloem protein 2-B10 | 2,20 | 0,00 | 2,19 | 0,02 |
| AT1G11260 | sugar transporter 1 | 2,18 | 0,01 | 1,23 | 0,49 |
| AT4G19530 | disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 2,17 | 0,00 | 3,90 | 0,00 |
| AT3G23570 | alpha/beta-Hydrolases superfamily protein | 2,17 | 0,01 | 1,29 | 0,48 |
| AT5G59540 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 2,16 | 0,00 | 4,61 | 0,00 |
| AT5G05750 | DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein | 2,14 | 0,00 | 6,30 | 0,00 |
| AT3G23880 | F-box and associated interaction domains-containing protein | 2,14 | 0,00 | 0,70 | 0,29 |
| AT4G37770 | l-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 8 | 2,14 | 0,01 | 0,96 | 0,90 |
| AT2G46600 | Calcium-binding EF-hand family protein | 2,14 | 0,00 | 1,21 | 0,50 |
| AT1G19640 | jasmonic acid carboxyl methyltransferase | 2,13 | 0,04 | 1,24 | 0,26 |
| AT4G18280 | glycine-rich cell wall protein-related | 2,12 | 0,00 | 3,62 | 0,04 |
| AT3G23605 | Ubiquitin-like superfamily protein | 2,12 | 0,00 | 0,84 | 0,43 |
| AT3G23660 | Sec23/Sec24 protein transport family protein | 2,12 | 0,00 | 0,75 | 0,16 |
| AT3G06470 | GNS1/SUR4 membrane protein family | 2,12 | 0,00 | 1,72 | 0,07 |

| AGI | Beschreibung | FC CHL27 | pval CHL27 | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|-------------|---------------|-----------|-------------|
| AT5G39030 | Protein kinase superfamily protein | 2,10 | 0,00 | 3,10 | 0,01 |
| AT3G23590 | REF4-related 1 | 2,09 | 0,00 | 0,84 | 0,36 |
| AT4G13050 | Acyl-ACP thioesterase | 2,09 | 0,00 | 1,94 | 0,05 |
| AT3G57770 | Protein kinase superfamily protein | 2,09 | 0,00 | 1,18 | 0,66 |
| AT5G50800 | Nodulin MtN3 family protein | 2,08 | 0,01 | 7,40 | 0,00 |
| AT1G31600 | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein | 2,07 | 0,00 | 3,67 | 0,00 |
| AT5G43740 | Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family | 2,07 | 0,00 | 2,98 | 0,05 |
| AT5G03960 | IQ-domain 12 | 2,05 | 0,03 | 1,65 | 0,09 |
| AT5G41700 | ubiquitin conjugating enzyme 8 | 2,05 | 0,01 | 3,56 | 0,02 |
| AT4G15680 | Thioredoxin superfamily protein | 2,05 | 0,00 | 2,68 | 0,02 |
| AT1G78290 | Protein kinase superfamily protein | 2,04 | 0,00 | 1,53 | 0,09 |
| AT3G23820 | UDP-D-glucuronate 4-epimerase 6 | 2,04 | 0,00 | 1,18 | 0,42 |
| AT5G50915 | basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein | 2,03 | 0,00 | 1,13 | 0,64 |
| AT4G15620 | Uncharacterised protein family (UPF0497) | 2,03 | 0,00 | 3,26 | 0,02 |
| AT3G28270 | Protein of unknown function (DUF677) | 2,02 | 0,03 | 2,71 | 0,10 |
| AT1G09910 | Rhamnogalacturonate lyase family protein | 2,02 | 0,00 | 2,56 | 0,01 |
| AT1G13950 | eukaryotic elongation factor 5A-1 | 2,02 | 0,00 | 2,11 | 0,16 |
| AT3G16670 | Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein | 0,50 | 0,03 | 1,10 | 0,86 |
| AT5G23570 | XS domain-containing protein / XS zinc finger domain-containing protein-related | 0,50 | 0,00 | 0,27 | 0,01 |
| AT1G49400 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein | 0,49 | 0,00 | 0,44 | 0,01 |
| AT4G08300 | nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein | 0,49 | 0,02 | 1,07 | 0,83 |
| AT2G22860 | phytosulfokine 2 precursor | 0,49 | 0,02 | 0,33 | 0,01 |
| AT1G26260 | cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 5 | 0,49 | 0,01 | 0,45 | 0,03 |
| AT5G01600 | ferretin 1 | 0,49 | 0,01 | 1,64 | 0,05 |
| AT5G15360 | Unknown protein | 0,49 | 0,01 | 0,60 | 0,11 |
| AT1G51380 | DEA(D/H)-box RNA helicase family protein | 0,48 | 0,00 | 0,67 | 0,43 |
| AT3G46900 | copper transporter 2 | 0,48 | 0,00 | 0,46 | 0,03 |
| AT1G11580 | methylesterase PCR A | 0,47 | 0,02 | 1,23 | 0,40 |
| AT2G01400 | Unknown protein | 0,47 | 0,00 | 0,38 | 0,01 |
| AT1G26530 | PIN domain-like family protein | 0,47 | 0,00 | 0,65 | 0,25 |
| AT4G22280 | F-box/RNI-like superfamily protein | 0,47 | 0,00 | 0,35 | 0,00 |
| AT3G28320 | Protein of unknown function (DUF677) | 0,47 | 0,01 | 0,07 | 0,00 |
| AT5G13200 | GRAM domain family protein | 0,46 | 0,01 | 0,77 | 0,30 |
| AT1G01940 | Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein | 0,46 | 0,00 | 0,52 | 0,07 |
| AT3G19710 | branched-chain aminotransferase4 | 0,46 | 0,01 | 1,13 | 0,50 |
| AT5G64510 | Unknown protein | 0,46 | 0,04 | 0,75 | 0,42 |
| AT3G14620 | cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 8 | 0,45 | 0,00 | 0,86 | 0,74 |
| AT2G24390 | AIG2-like (avirulence induced gene) family protein | 0,45 | 0,00 | 0,41 | 0,03 |
| AT4G24540 | AGAMOUS-like 24 | 0,45 | 0,00 | 0,73 | 0,15 |
| AT2G16750 | Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain | 0,45 | 0,00 | 0,43 | 0,03 |
| AT5G59330 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,45 | 0,04 | 0,37 | 0,01 |
| AT5G19100 | Eukaryotic aspartyl protease family protein | 0,44 | 0,00 | 0,42 | 0,01 |
| AT3G24360 | ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein | 0,44 | 0,01 | 0,48 | 0,16 |
| AT2G23770 | protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein | 0,44 | 0,01 | 0,56 | 0,06 |
| AT5G45040 | Cytochrome c | 0,44 | 0,00 | 0,27 | 0,00 |
| AT1G58160 | Mannose-binding lectin superfamily protein | 0,44 | 0,00 | 0,84 | 0,35 |
| AT4G27300 | S-locus lectin protein kinase family protein | 0,43 | 0,00 | 0,25 | 0,01 |
| AT5G20830 | sucrose synthase 1 | 0,43 | 0,03 | 1,73 | 0,20 |
| AT2G14560 | Protein of unknown function (DUF567) | 0,43 | 0,03 | 0,70 | 0,25 |
| AT3G56710 | sigma factor binding protein 1 | 0,43 | 0,01 | 0,59 | 0,13 |
| AT5G27240 | DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein | 0,42 | 0,00 | 0,47 | 0,06 |
| AT1G73090 | Unknown protein | 0,42 | 0,00 | 0,59 | 0,08 |
| AT5G46520 | Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family | 0,42 | 0,01 | 0,78 | 0,34 |
| AT2G15042 | Leucine-rich repeat (LRR) family protein | 0,42 | 0,01 | 0,29 | 0,00 |
| AT4G19430 | Unknown protein | 0,41 | 0,05 | 1,02 | 0,94 |
| AT2G31230 | ethylene-responsive element binding factor 15 | 0,40 | 0,00 | 0,55 | 0,03 |
| AT5G62210 | Embryo-specific protein 3, (ATS3) | 0,40 | 0,02 | 0,38 | 0,01 |
| AT4G31870 | glutathione peroxidase 7 | 0,40 | 0,00 | 0,53 | 0,16 |
| AT1G70870 | Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein | 0,40 | 0,00 | 0,57 | 0,06 |
| AT1G63540 | hydroxyproline-rich glycoprotein family protein | 0,38 | 0,00 | 0,67 | 0,22 |
| AT1G22690 | Gibberellin-regulated family protein | 0,38 | 0,00 | 0,60 | 0,12 |
| AT2G40960 | Single-stranded nucleic acid binding R3H protein | 0,37 | 0,00 | 0,27 | 0,01 |
| AT3G03320 | RNA-binding ASCH domain protein | 0,37 | 0,00 | 0,38 | 0,02 |
| AT3G49580 | response to low sulfur 1 | 0,37 | 0,04 | 0,90 | 0,62 |
| AT5G47250 | LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein | 0,36 | 0,00 | 0,32 | 0,00 |
| AT1G71140 | MATE efflux family protein | 0,36 | 0,01 | 0,42 | 0,04 |
| AT1G50290 | Unknown protein | 0,36 | 0,00 | 0,09 | 0,00 |
| AT2G07688 | Unknown protein | 0,36 | 0,00 | 0,13 | 0,00 |
| ATCG00020 | photosystem II reaction center protein A | 0,36 | 0,00 | 0,13 | 0,00 |
| AT1G06160 | octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF 59 | 0,35 | 0,01 | 0,46 | 0,21 |
| AT2G15790 | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin-40 (CYP40) / rotamase | 0,34 | 0,00 | 0,53 | 0,08 |
| AT1G52770 | Phototropic-responsive NPH3 family protein | 0,34 | 0,00 | 0,44 | 0,22 |
| AT1G13470 | Protein of unknown function (DUF1262) | 0,32 | 0,02 | 0,30 | 0,11 |
| AT5G10140 | K-box region and MADS-box transcription factor family protein | 0,32 | 0,00 | 0,21 | 0,00 |
| AT1G45145 | thioredoxin H-type 5 | 0,31 | 0,04 | 0,47 | 0,05 |
| AT1G62540 | flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 2 | 0,31 | 0,00 | 0,81 | 0,51 |
| AT4G15440 | hydroperoxide lyase 1 | 0,28 | 0,00 | 0,27 | 0,04 |

| AGI | Beschreibung | FC CHL27 | pval CHL27 | FC LUC | pval LUC |
|-----------|---|-------------|---------------|-----------|-------------|
| AT2G14580 | basic pathogenesis-related protein 1 | 0,27 | 0,02 | 0,26 | 0,01 |
| AT3G46500 | 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein | 0,27 | 0,00 | 0,30 | 0,03 |
| AT1G02300 | Cysteine proteinases superfamily protein | 0,27 | 0,00 | 0,20 | 0,00 |
| AT1G05680 | Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2 | 0,25 | 0,01 | 2,28 | 0,15 |
| AT5G48850 | Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein | 0,25 | 0,01 | 0,85 | 0,40 |
| AT5G59845 | Gibberellin-regulated family protein | 0,24 | 0,00 | 0,45 | 0,01 |
| AT3G48640 | Unknown protein | 0,23 | 0,00 | 0,10 | 0,00 |
| AT5G03545 | Unknown protein | 0,21 | 0,04 | 0,91 | 0,91 |
| AT1G69720 | heme oxygenase 3 | 0,20 | 0,00 | 0,16 | 0,02 |
| AT5G55570 | Unknown protein | 0,19 | 0,00 | 0,29 | 0,00 |
| AT3G30720 | qua-quine starch | 0,18 | 0,00 | 8,10 | 0,00 |
| AT2G26560 | phospholipase A 2A | 0,18 | 0,00 | 0,24 | 0,01 |
| AT1G62510 | Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein | 0,17 | 0,00 | 0,34 | 0,05 |
| AT3G28740 | Cytochrome P450 superfamily protein | 0,16 | 0,00 | 0,59 | 0,07 |
| AT4G37150 | methyl esterase 9 | 0,15 | 0,00 | 0,16 | 0,01 |
| AT1G09420 | glucose-6-phosphate dehydrogenase 4 | 0,13 | 0,00 | 0,16 | 0,00 |
| AT1G21120 | O-methyltransferase family protein | 0,09 | 0,00 | 0,05 | 0,00 |
| AT4G03060 | AOP2 (ALKENYL HYDROXYALKYL PRODUCING 2) | 0,07 | 0,00 | 0,16 | 0,00 |
| AT5G23020 | 2-isopropylmalate synthase 2 | 0,06 | 0,00 | 0,04 | 0,00 |
| AT1G54040 | epithiospecifier protein | 0,05 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| AT4G29200 | Beta-galactosidase related protein | 0,04 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| AT2G15555 | other RNA | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,00 |
| AT5G44420 | plant defensin 1 | 0,01 | 0,00 | 0,17 | 0,29 |

Tabelle 11: Sequenzen der klonierten RNAi-Fragmente

| RNAi Linie | Codierende Region | Sequenz 5' - 3' |
|---------------|----------------------|--|
| CHLH | 2789 - 3067 | CGTGGCGCTGTTTCCGCCTTTGTGGAAAAACAACAAATAGCAAAGGACAGGTGGTGG ATGTGTCTGACAAGCTTACCTCGCTTCTTGGGTTTGGAAATCAATGAGCCATGGGTTGAG TATTTGTCCAACACCAAGTTCTACAGGGCGAACAGAGATAAGCTCAGAACAGTGTGTTG GTTTCCTTGGAGAGTGCCTGAAGTTGGTGGTTCATGGACAACGAAGTGGAGTCTAAT GCAAGCTTTGGAAGGCAAGTACGTCGAGCCTGGCCCCGGAGGTGAT |
| CHLD | 2034-2201 | GGCTGTAAAGAGTAGGACTTAACGCAGAGAAGAGTGGTGTATGTCGGGCGCATAATGATT GTTGCGATAACCGATGGTGCAGGCCAACATTACACTGAAAAGATCAACTGATCCGGAGT CTATTGCCCCAGATGCTCCTAGACCCACGTCCAAAGAATTGAA |
| CHLM | 726 - 1114 | CAAAGGCACAACTACCATCAGAGAAATTTACCAAAATTTGAGGTGAATGATTTGGAGAG CCTAACTGGGAAGTATGATACCGTTGTATGTCTCGACGTGTTGATACATTACCCGCAGA ACAAAGCAGACGGAATGATCGCACATCTTGCTTCTTTAGCAGAGAAGAGAGTGATTCT GAGTTTGTCTCCAAAGACTTTTACTATGATATCTTAAAGAGAATTGGAGAGCTTTTCC CAGGGCCATCAAAAAGCTACAAGGGCGTATCTACACTCGGAGGCGGATGTGGAAAGAGC GTTGGGTAAAGTCGGCTGGAAAATCAGCAAGAGAGGACTCACTACCACACAGTTCTAC TTCTCTAGGCTCATCGAAGCTGTTCCAATGTAGACCAAT |
| CHL27 | 320 - 624 | ACAACCAGACACATTTCTGTAGGAACAAGGAGTTTAAAGAAGCTGCAGACAAATTGCA AGGACCTCTCCGACAGATCTTCGTTGAGTTCCTTGAGCGGTCTTGTAAGTCTGAGTTCTC TGGTTTCCTTCTCTACAAGGAGCTTGGTGAAGACTCAAGAAAAACAAACCCTGTTGTGG CTGAGATCTTCTCTTATGTCTAGAGATGAAGCAAGACATGCCGGGTTCTTGAACAAG GGATTGTCTGATTCAACTTGGCTCTTGATTGGGTTTCCTGACAAAGGCAAGGAAATA C |

Tabelle 12: Primertabelle

| Nr. | Name | Sequence (5' – 3') | AGI | Information |
|-----|----------------|----------------------------|-----------|-------------|
| 1 | qRT FeCH1_fw | AGCCGTTCCAGTCAGTTTCGT | AT5G26030 | |
| 2 | qRT FeCH1_rev | CTCCATGTCTATCTCCTCAAGTGTCT | | |
| 3 | qRT Act2-2_fw | CTTCCCTCAGCACATTCCAG | | |
| 4 | qRT Act2-2_rev | GACCTGCCTCATCATACTCG | At3g18780 | |
| 5 | qRT PORB_fw | TGATTACCCTTCAAAGCGTCTCA | | |
| 6 | qRT PORB_rev | CAATGTATTCTGTTCCCGGT | | |
| 7 | qRT CHLH_fw | CTGGTCGTGACCCTAGAACAG | AT5G13630 | |
| 8 | qRT CHLH_rev | GATTGCCAGCTTCTCTCTG | | |
| 9 | qRT CHLD_fw | GGGAAGATATACAAGGCAGGG | | |
| 10 | qRT CHLD_rev | GAGATTACAGCATCCGAAGCA | AT1G08520 | |

| Nr. | Name | Sequence (5' – 3') | AGI | Information |
|-----|-------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|
| 11 | qRT CHLM_fw | TTGCTGAAGCTGAGATGAAGGCAAAG | AT4G25080 | |
| 12 | qRT CHLM_rev | CAACGGTATCATACTTCCCAGTTAGG | | |
| 13 | qRT CHL27_fw | GCTTCTTCTGCTCTCGGTTTATG | AT3G56940 | |
| 14 | qRT CHL27_rev | GCCGTGGTTCGGTTGTCTCG | | |
| 15 | qRT Gun4_fw | CTCCATTGCCAATCTCAC | AT3G59400 | |
| 16 | qRT Gun4_rev | CCGAATCTACCATCACTGTG | | |
| 17 | qRT HemA1_fw | TTGCTGCCAACAAGAAGAC | AT1G58290 | |
| 18 | qRT HemA1_rev | CCGTCTCCAATGAATCCCTC | | |
| 19 | qRT_AT1G02300_fw | ATGATGGTTACTTCAAGATCAGGAG | AT1G02300 | |
| 20 | qRT_AT1G02300_rev | TTACAGAAGTAGGGACACATCGT | | |
| 21 | qRT_AT1G06160_fw | ACATCTTCTCCTTCTTCTCCTC | AT1G06160 | |
| 22 | qRT_AT1G06160_rev | TCTTGCGTCATAACAACACTCTG | | |
| 23 | qRT_AT1G19640_fw | TCGTTCTTGGTAGAAGATCAC | AT1G19640 | |
| 24 | qRT_AT1G19640_rev | TTCTCTTCTCGATGATACCTT | | |
| 25 | qRT_AT1G62510_fw | CCCTAAACCCAAGCCAACAC | AT1G62510 | |
| 26 | qRT_AT1G62510_rev | CCTCAAGATCAGCGAGTCCT | | |
| 27 | qRT_AT1G65490_fw | CAAAGTCACCAAATATTGTGCGAC | AT1G65490 | |
| 28 | qRT_AT1G65490_rev | CAAATACTGATGCTGGAGAACCT | | |
| 29 | qRT_AT1G72670_fw | CAAGAAGGAGCAATCAAGAGGG | AT1G72670 | |
| 30 | qRT_AT1G72670_rev | CATCGGTCAAGCCAATTCCA | | |
| 31 | qRT_AT1G74810_fw | TAGAAACCCGCTTGAAGTCTC | AT1G74810 | |
| 32 | qRT_AT1G74810_rev | AATCTCAGCATCACACTCTTGG | | |
| 33 | qRT_AT1G76240_fw | AAGAGTTTGATGAAGAGGATGATGG | AT1G76240 | |
| 34 | qRT_AT1G76240_rev | TGTGTTAGGGCATTAAAGCAATGAG | | |
| 35 | qRT_AT1G80280_fw | CTTACACTCTGGATAATCAGGTAGAC | AT1G80280 | |
| 36 | qRT_AT1G80280_rev | CCAACCAAGACTACAGAAGCA | | |
| 37 | qRT_AT2G14460_fw | CTCTCGTCATCCTTACATACAAGCA | AT2G14460 | |
| 38 | qRT_AT2G14460_rev | CCTCCTTTCAACTTCATTGCGC | | |
| 39 | qRT_AT2G14580_fw | TTTGCGGTCACTACACTCAG | AT2G14580 | |
| 40 | qRT_AT2G14580_rev | CATCTCACTTTAGCACATCCGA | | |
| 41 | qRT_AT3G05640_fw | CGTAGATTTCAAGCCAAACCTG | AT3G05640 | |
| 42 | qRT_AT3G05640_rev | TGATACAATAGTCTCCGAATGCTC | | |
| 43 | qRT_AT3G28740_fw | ACTTCTCTACAAGAACTCAGCCT | AT3G28740 | |
| 44 | qRT_AT3G28740_rev | ATCGCCCATTCTAACGTTCCA | | |
| 45 | qRT_AT3G46500_fw | TATAGTAGAATGTCTTCTACCTGCC | AT3G46500 | |
| 46 | qRT_AT3G46500_rev | ATGCTCAAATCCACTTGTGAATCC | | |
| 47 | qRT_AT3G61490_fw | ACACCGACGGAATCAATCCA | AT3G61490 | |
| 48 | qRT_AT3G61490_rev | TCGCCGATATGATGTAACAGTC | | |
| 49 | qRT_AT4G03060_fw | CCCGAATACTTTTCAATTGTTATTGCC | AT4G03060 | |
| 50 | qRT_AT4G03060_rev | GCCCTGATTCTACCATTCTATAAGAG | | |
| 51 | qRT_AT4G29200_fw | ATGATCCTTCGATTACTGTGACCT | AT4G29200 | |
| 52 | qRT_AT4G29200_rev | AAGCATTACAACAAACGGTATTCCC | | |
| 53 | qRT_AT5G05290_fw | CCTTCTCCAGATCGCTCAG | AT5G05290 | |
| 54 | qRT_AT5G05290_rev | TTATCGTAAACCTTATCCCTCCACC | | |
| 55 | qRT_AT5G50800_fw | ACTTCTACGTTGCCCTTCCA | AT5G50800 | |
| 56 | qRT_AT5G50800_rev | GGATTATCTGTCTTCTGAGCCAC | | |
| 57 | qRT_AT1G26290_fw | AGAGAAAAGAAGTTGTAGCAGTTGG | AT1G26290 | |
| 58 | qRT_AT1G26290_rev | TACCAGCATATAGGCACAGATCC | | |
| 59 | qRT_AT1G56010_fw | AGCTCTCAAAGGAAGACTGGGT | AT1G56010 | |
| 60 | qRT_AT1G56010_rev | TGCAGAGGCTGTCTCATCAAAACA | | |
| 61 | qRT_PC_fw | TGGTGTTCGACGAAGACGAG | At1g76100 | Woodson et al. 2011 |
| 62 | qRT_PC_rev | AGATCTTGCTTGCGTCCACA | | |
| 63 | qRT_LHCB1.2_fw | GGACTTGCTTTACCCCGGTG | At1g29910 | Woodson et al. 2011 |
| 64 | qRT_LHCB1.2_rev | TCGGTAGCAAGACCAATGG | | |

| Nr. | Name | Sequence (5' – 3') | AGI | Information |
|-----|--------------------|---|-----------|---------------------|
| 65 | qRT_RBCS_fw | GCAACGGCGGAAGAGTTAAC | At1g67090 | Woodson et al. 2011 |
| 66 | qRT_RBCS_rev | TCTTTCCAATCGGAGGCCA | | |
| 67 | qRT_BAP1_fw | GTGGGATCGTCAATCTTTTCG | At3g61190 | Baruah et al. 2009 |
| 68 | qRT_BAP1_rev | GGCCACCGTATCCATCAATC | | |
| 69 | qRT_ZAT12_fw | TGCGAGTCACAAGAAGCCTA | At5g59820 | Baruah et al. 2009 |
| 70 | qRT_ZAT12_rev | GTGTCCTCCCAAAGCTTGTC | | |
| 71 | qRT_GPX7_fw | GCTGGTGGTTTCTTGGTGAT | AT4G31870 | Gaber et al. 2012 |
| 72 | qRT_GPX7_rev | CTCTCGACAACCTTGCCCTTTT | | |
| 73 | qRT_FSD1_fw | TCCAGAACCGAAGACCAGAT | AT4G25100 | Baruah et al. 2009 |
| 74 | qRT_FSD1_rev | AGAACTCACTGTCCTGAAGTC | | |
| 75 | att-chlH-RNAi-fw | AAAGCAGGCTATACACGTGGCGCTGTTTCC GCCT | | |
| 76 | att-chlH-RNAi-rev | CAAGAAAAGCTGGGTATCACCTCCGGGGCCA GGCT | | |
| 77 | att-chlD-RNAi-fw | AAAAAGCAGGCTATACAatggcgatgactccggtcg | | |
| 78 | att-chlD-RNAi-rev | TACAAGAAAAGCTGGGTAtcaagaattcttcagatcagat agtgc | | |
| 79 | att-chlM-RNAi-fw | AAAGCAGGCTATACACAAAGGCACAACCTA CCATC | | |
| 80 | att-chlM-RNAi-rev | TACAAGAAAAGCTGGGTAATTGGTCTACATT GGAACAGCTTC | | |
| 81 | att-chl27-RNAi-fw | AAAAAGCAGGCTATACAacaaccagacatttcgtga g | | |
| 82 | att-chl27-RNAi-rev | TACAAGAAAAGCTGGGTAgatttcttgccttgcagg | | |

Tabelle 13: Ausschließlich deregulierte Gene in den RNAi-Linien

| Ausschließlich deregulierte Gene | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| CHLH-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT3G22120 | AT3G20370 | AT5G29000 | AT2G01890 | AT4G11850 | AT3G01470 | AT5G25490 | AT1G65560 | AT1G11330 | AT5G03840 | AT1G08230 |
| AT5G35490 | AT3G19380 | AT3G16690 | AT1G29720 | AT5G26280 | AT3G01472 | AT4G14815 | AT1G74210 | AT5G17790 | AT5G02140 | AT2G36570 |
| AT5G35450 | AT1G07880 | AT5G13630 | | | | | | | | |
| CHLM-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT2G38780 | AT3G06160 | AT3G62410 | AT5G24240 | AT1G35710 | AT3G29810 | AT3G46490 | AT5G45820 | | | |
| CHL27-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT1G51380 | AT2G14900 | AT1G06080 | AT1G11580 | AT3G49580 | AT1G01940 | AT5G64510 | AT1G73090 | AT2G05540 | AT5G57650 | AT3G14620 |
| AT3G23605 | AT5G65080 | AT3G16770 | AT2G31230 | AT4G11210 | AT4G37770 | AT2G46600 | AT2G23770 | AT3G06470 | AT3G57770 | AT3G56940 |
| AT5G03545 | AT3G23640 | AT2G14560 | AT1G58160 | AT5G13200 | AT3G23880 | AT3G23660 | AT3G16670 | AT2G38180 | AT5G50915 | AT5G65390 |
| AT5G20830 | AT1G06530 | AT5G58570 | AT3G23570 | AT1G45145 | AT4G08300 | AT4G19430 | AT4G24540 | AT5G65300 | AT3G23820 | AT3G23590 |
| AT3G19710 | AT5G03960 | AT3G56710 | | | | | | | | |
| LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT5G66400 | AT1G79520 | AT5G53050 | AT1G20390 | AT1G32860 | AT1G33240 | AT2G41940 | AT4G30460 | AT1G63050 | AT3G54260 | AT3G61430 |
| AT5G51690 | AT2G46270 | AT3G52070 | AT5G03200 | AT1G03080 | AT4G33810 | AT4G16890 | AT4G39210 | AT3G50970 | AT3G52500 | AT3G10910 |
| AT4G32870 | AT2G43130 | AT2G33830 | AT1G76180 | AT3G45970 | AT1G73620 | AT5G60100 | AT2G20460 | AT5G56630 | AT1G22530 | AT1G47960 |
| AT2G36830 | AT4G24960 | AT2G23330 | AT3G15353 | AT3G14060 | AT1G16260 | AT1G03870 | AT5G61820 | AT5G59480 | AT2G25620 | AT3G10912 |
| AT4G20480 | AT2G41190 | AT2G33380 | AT4G32940 | AT2G46690 | AT3G60080 | AT4G33905 | AT1G73600 | AT1G12080 | AT1G56170 | AT4G15420 |
| AT5G59130 | AT2G37040 | AT3G58120 | AT1G02400 | AT3G27880 | AT3G04010 | AT1G07430 | AT1G62200 | AT1G62500 | AT1G79720 | AT1G14890 |
| AT2G02990 | AT1G43170 | AT1G66830 | AT1G09415 | AT1G19610 | AT1G17455 | AT1G23850 | AT2G16890 | AT4G35090 | AT3G53960 | AT2G28400 |
| AT5G59820 | AT1G23480 | AT4G28140 | AT4G39180 | AT4G04110 | AT3G14440 | AT1G76960 | AT2G47770 | AT3G17770 | AT5G66460 | AT2G41870 |
| AT5G56910 | AT5G54300 | AT4G05100 | AT2G37870 | AT4G25480 | AT2G42610 | AT1G80840 | AT5G41600 | AT4G19470 | AT2G04570 | AT1G70890 |
| AT5G49500 | AT3G66380 | AT2G34500 | AT3G51450 | AT2G39110 | AT1G59840 | AT4G03210 | AT1G20840 | AT5G22460 | AT1G08210 | AT1G80110 |
| AT1G64360 | AT4G11290 | AT5G45570 | AT1G57770 | AT1G72430 | AT1G68440 | AT2G25510 | AT5G56870 | AT4G21940 | AT3G11410 | AT1G48100 |
| AT1G78070 | AT2G02130 | AT4G22620 | AT4G23820 | AT1G46768 | AT1G04220 | AT5G53120 | AT1G73602 | AT1G79500 | AT2G46680 | AT1G19540 |
| AT5G02100 | AT5G46460 | AT5G24120 | AT5G51440 | AT1G19180 | AT5G43150 | AT5G27210 | AT4G14560 | AT2G35960 | AT2G07718 | AT2G45760 |
| AT1G01010 | AT4G22592 | AT5G24080 | AT5G04760 | AT5G37890 | AT4G31000 | AT1G28010 | AT5G53710 | AT2G16660 | AT4G25490 | AT2G21220 |
| AT4G33550 | AT4G22590 | AT2G04790 | AT5G27270 | AT1G09350 | AT2G28660 | AT1G70420 | AT5G64380 | AT4G11840 | AT5G49520 | AT4G01026 |
| AT3G63010 | AT5G03090 | AT1G62150 | AT5G22700 | AT5G49555 | AT5G06530 | AT1G19510 | AT5G08370 | AT5G50130 | AT1G64380 | AT4G30470 |
| AT4G02075 | AT5G47640 | AT2G47730 | AT3G09440 | AT3G22210 | AT1G31820 | AT4G16250 | AT2G32235 | AT3G27270 | AT1G10920 | AT4G18930 |
| AT1G27200 | AT1G19970 | AT2G22980 | AT2G33810 | AT4G05050 | AT3G22231 | AT1G76090 | AT4G38850 | AT4G27657 | AT5G47220 | AT1G55330 |
| AT1G32360 | AT4G01900 | AT4G36670 | AT1G66940 | AT3G12580 | AT3G05230 | AT3G43510 | AT4G12030 | AT4G35550 | AT4G28250 | AT3G22840 |
| AT2G06050 | AT1G22740 | AT5G19210 | AT3G52340 | AT4G22820 | AT5G10340 | AT1G61340 | AT4G21400 | AT1G30640 | AT1G10370 | AT1G20070 |
| AT1G56650 | AT1G68600 | AT5G06690 | AT3G23730 | AT1G20450 | AT2G04350 | AT3G56080 | AT1G77450 | AT3G63060 | AT4G00950 | AT2G39890 |
| AT2G14520 | AT1G68560 | AT5G57050 | AT5G61590 | AT5G54860 | AT2G46250 | AT3G28180 | AT1G49630 | AT5G59320 | AT1G77060 | AT3G48350 |
| AT5G11650 | AT2G20880 | AT1G70300 | AT1G31200 | AT3G07010 | AT2G43290 | AT1G60190 | AT1G15100 | AT3G22600 | AT5G42050 | AT4G34710 |
| AT3G43800 | AT2G42580 | AT2G22080 | AT5G14700 | AT1G68500 | AT1G67920 | AT2G16990 | AT4G27050 | AT4G16990 | AT3G60130 | AT3G06080 |
| AT2G23120 | AT3G17000 | AT1G08940 | AT1G79000 | AT5G59780 | AT1G61890 | AT5G47330 | AT2G07783 | AT2G32990 | AT1G79460 | AT1G57650 |
| AT2G44740 | AT4G17550 | AT3G51895 | AT2G07811 | AT3G02040 | AT2G37770 | AT5G15240 | AT1G73390 | AT2G14880 | AT3G26744 | AT1G66200 |
| ATMG00590 | AT3G08890 | AT1G76650 | AT3G26320 | AT1G22550 | AT3G26700 | AT2G03760 | AT4G11360 | AT5G22510 | AT5G13400 | AT3G09310 |
| AT1G52690 | AT4G17340 | AT5G04750 | AT4G11650 | AT5G10930 | AT5G60890 | AT1G04040 | AT1G01520 | AT3G23920 | AT5G56980 | AT3G17790 |
| AT5G52300 | AT2G47780 | AT2G38610 | AT3G49780 | AT3G14310 | AT5G19875 | AT3G26220 | AT4G12580 | AT2G36590 | AT1G61740 | AT1G55265 |
| AT4G21650 | AT2G25200 | AT5G37130 | AT5G64640 | AT4G37490 | AT5G53130 | AT2G43940 | AT5G23010 | AT1G36160 | AT2G39350 | AT3G61890 |
| AT3G21890 | AT3G21420 | AT4G26150 | AT1G35230 | AT2G17840 | AT2G15560 | AT1G62710 | AT3G18980 | AT2G43530 | AT1G67360 | AT3G24520 |
| AT1G77760 | AT5G45340 | AT1G56510 | AT3G46450 | AT2G44790 | AT2G44300 | AT5G52900 | AT4G15260 | AT3G10020 | AT5G17160 | AT1G28560 |
| AT2G18660 | AT2G35980 | AT5G16980 | AT1G66760 | AT1G72060 | AT1G47530 | AT2G35820 | AT4G12420 | AT1G11545 | AT2G16720 | AT5G25560 |
| AT1G63800 | ATMG00830 | AT1G31550 | AT2G07667 | AT5G11610 | AT2G47950 | AT3G13450 | AT1G65290 | AT2G42530 | AT3G06500 | AT4G13630 |
| AT1G07720 | AT5G16600 | AT1G77680 | AT3G28007 | AT1G32870 | AT4G00710 | AT3G13672 | AT4G36010 | AT2G44450 | AT5G52310 | AT2G23110 |
| AT3G43270 | AT1G53170 | AT5G43440 | AT1G27730 | AT1G01720 | AT1G20030 | AT1G21100 | AT2G42870 | AT1G62250 | AT3G15630 | AT2G30930 |
| AT1G15310 | AT3G09050 | AT1G43160 | AT4G28780 | AT2G32240 | AT2G38640 | AT1G61667 | AT5G01520 | AT2G39700 | AT4G27520 | AT5G59220 |
| AT3G50760 | AT3G54920 | AT3G62920 | AT4G12432 | AT2G40900 | AT1G75370 | AT1G54020 | AT5G18040 | AT2G24540 | AT3G61630 | AT4G00900 |
| AT5G49480 | AT5G63130 | AT1G30880 | AT2G23430 | AT3G29035 | AT1G50460 | AT4G35560 | AT5G52050 | AT4G27060 | AT2G18690 | AT3G15590 |
| AT3G54200 | AT1G64190 | AT3G10520 | AT3G27340 | AT4G16880 | AT4G26080 | AT1G62560 | AT1G13740 | AT5G641685 | AT5G15190 | AT3G62060 |
| AT3G17609 | AT1G61120 | AT5G03210 | AT5G27930 | AT4G12000 | AT3G62150 | AT1G49450 | AT1G80610 | AT5G67300 | AT5G03050 | AT3G53230 |
| AT1G27030 | AT5G05410 | AT4G12010 | AT2G42540 | AT2G38310 | AT1G13210 | AT2G32800 | AT3G54950 | AT3G03250 | AT5G25190 | AT5G06760 |
| AT5G04340 | AT2G02590 | AT2G15390 | AT3G26290 | AT3G15770 | AT1G20440 | AT1G24100 | AT5G58670 | AT2G43620 | AT2G33850 | AT4G19420 |
| AT4G21440 | AT4G02280 | AT1G05100 | AT1G01470 | AT1G62570 | AT5G44020 | AT2G36950 | AT1G19020 | AT1G665280 | AT2G14610 | AT2G25080 |
| AT5G53970 | AT2G44500 | AT1G51090 | AT1G57630 | AT1G21410 | AT4G39970 | AT5G62470 | AT2G41210 | AT3G02150 | AT5G20150 | AT1G73260 |
| AT5G11090 | AT2G19930 | AT4G12430 | AT1G56600 | AT4G34000 | AT3G61210 | AT5G59310 | AT4G37320 | AT4G23180 | AT1G16850 | AT1G07280 |
| AT1G62480 | AT5G26340 | AT3G57020 | AT1G03950 | AT1G33260 | AT5G40390 | AT5G45160 | AT5G03120 | AT1G13930 | AT4G27410 | AT1G53430 |
| AT3G57540 | AT1G06830 | AT3G29100 | AT4G00030 | AT1G21550 | AT2G24220 | AT4G28270 | AT3G17520 | AT1G51940 | AT1G58340 | AT3G14350 |
| AT3G28100 | AT1G79270 | AT5G39950 | AT1G73750 | AT3G02480 | AT5G52540 | AT1G72770 | AT3G07090 | AT4G14010 | AT3G50260 | AT3G56260 |
| AT1G69260 | AT3G48460 | AT5G12170 | AT3G15720 | AT1G73480 | AT4G08950 | | | | | |

Tabelle 14: Zugehörigkeit der deregulierten Gene zu den verschiedenen Schnittmengen zwischen den RNAi-Linien

| Schnittmengen von deregulierten Genen |
|---------------------------------------|
| |
| |
| |

| CHLM- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AT1G73880 | AT1G22440 | AT3G28310 | AT4G14400 | AT3G23550 | AT2G43820 | AT5G26270 | AT4G11890 | | | |
| CHLM- und CHLH-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT3G03910 | AT5G18840 | AT5G07460 | AT5G15980 | AT1G17960 | AT2G39710 | AT1G54120 | AT1G23090 | AT1G20700 | AT1G67860 | AT1G70430 |
| AT4G01390 | AT3G52490 | AT3G16450 | AT1G65480 | | | | | | | |
| CHLM- und CHL27-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT3G24360 | AT3G05890 | | | | | | | | | |
| CHLH- und CHL27-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT5G43740 | AT5G01600 | AT1G05680 | AT1G78290 | AT1G43590 | | | | | | |
| CHLH- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT4G22212 | AT1G78320 | AT4G19100 | AT1G65370 | AT3G57710 | AT4G04220 | AT5G24160 | AT1G66090 | AT3G27360 | | |
| CHL27- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT1G09910 | AT4G15680 | AT1G49400 | AT2G24390 | AT4G18280 | AT1G26260 | AT5G41700 | AT2G22860 | | | |
| CHLH-, CHLM- und CHL27-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT2G46450 | AT1G70870 | AT1G06160 | AT4G16950 | AT3G15310 | AT5G44420 | AT1G65490 | AT3G28270 | AT5G15360 | AT1G27460 | AT4G24040 |
| AT1G62540 | AT4G31870 | AT1G03020 | AT4G17370 | AT5G43760 | AT1G19640 | AT2G15790 | AT2G33320 | AT3G28740 | AT5G27240 | AT1G52770 |
| AT1G66100 | AT5G48850 | AT1G13650 | AT1G13470 | AT1G22690 | AT5G63020 | AT5G46520 | AT1G11260 | AT1G72920 | AT4G13050 | AT1G13950 |
| AT1G63540 | | | | | | | | | | |
| CHLH-, CHLM- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT5G07690 | AT5G05270 | AT1G12200 | AT3G50480 | AT5G42840 | AT2G29120 | AT3G06760 | AT3G44890 | AT1G65920 | AT5G10400 | AT1G23750 |
| AT3G44970 | AT3G62130 | AT3G13110 | AT3G14210 | | | | | | | |
| CHLH-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT5G59330 | AT5G39030 | AT5G19100 | AT5G62210 | AT5G24210 | | | | | | |
| CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT5G02260 | AT3G29575 | AT3G30720 | AT2G01400 | AT2G16750 | AT5G23570 | AT4G15620 | | | | |
| CHLH-, CHLM-, CHL27- und LUC-RNAi-Linie | | | | | | | | | | |
| AT3G48640 | AT5G36930 | AT5G17890 | AT5G44580 | AT5G50800 | AT1G58270 | AT4G37150 | AT4G27300 | AT3G57470 | AT5G05750 | AT4G23680 |
| AT4G03060 | AT1G59900 | AT3G44630 | AT1G74810 | AT1G50290 | AT1G67865 | AT2G14580 | AT5G41650 | AT1G09420 | AT4G03820 | AT1G56010 |
| AT2G15050 | AT3G46530 | AT4G22930 | AT5G23020 | AT2G26560 | AT3G46500 | ATCG00020 | AT1G78970 | AT5G05290 | AT2G07688 | AT1G26290 |
| AT5G59845 | AT5G59540 | AT2G40960 | AT5G45500 | AT2G14460 | AT1G73490 | AT4G15440 | AT1G66980 | AT5G45040 | AT1G80280 | AT1G63880 |
| AT2G25450 | AT2G02360 | AT5G55570 | AT3G28320 | AT4G23220 | AT1G35612 | AT1G21120 | AT1G31600 | AT5G10140 | AT4G22280 | AT5G50100 |
| AT4G32240 | AT1G64950 | AT3G05640 | AT3G44430 | AT5G47250 | AT5G40910 | AT5G16220 | AT1G69550 | AT5G17880 | AT3G46900 | AT2G15555 |
| AT3G19430 | AT1G02300 | AT3G47250 | AT1G71140 | AT1G23960 | AT4G16860 | AT3G16750 | AT1G72670 | AT1G62510 | AT1G22590 | AT4G19530 |
| AT1G69720 | AT4G02540 | AT3G61490 | AT2G03710 | AT5G56380 | AT2G15042 | AT2G01090 | AT4G09030 | AT1G73680 | AT4G29200 | AT1G54040 |
| AT5G27750 | AT3G43740 | AT5G55790 | AT3G03320 | AT4G19500 | AT1G76240 | AT5G24150 | AT4G08110 | AT5G41140 | AT1G21130 | AT5G66110 |

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 6. Juli 2009. Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberaterinnen/Promotionsberatern stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Berlin, _____

Hagen Schlicke